Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

*

ZUM METABOLISMUS DER ANTIDEPRESSIVA AMITRIPTYLIN UND NORTRIPTYLIN BEI KANINCHEN, RATTE UND HUND

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Peipei YAO
Shanghai

1981

Aus dem Institut für Toxikologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. H. Remmer

*

ZUM METABOLISMUS DER ANTIDEPRESSIVA AMITRIPTYLIN UND NORTRIPTYLIN BEI KANINCHEN, RATTE UND HUND

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
(Theoretische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von

Peipei YAO

Shanghai

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Prof. Dr. med. H. Haselmann
1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. U. Breyer-Pfaff
2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. H. P. T. Ammon

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
	Abkürzungen	4
	Strukturformeln	6
2.	MATERIAL UND METHODEN	
2.1.	Geräte	8
2.2.	Substanzen und Chromatographie-Material	8
2.3.	Versuche in vitro mit Amitriptylin und Nortriptylin	10
2.3.1.	Behandlung der Tiere	10
2.3.1.1.	Phenobarbital	10
2.3.1.2.	Pregnenolon-16α-carbonitril	10
2.3.1.3.	ß-Naphthoflavon	10
2.3.2.	Präparation von Mikrosomen	10
2.3.3.	Eiweissbestimmung	11
2.3.4.	Messung der Cytochrome b_5 und P-450	12
2.3.5.	Inkubation mit Lebermikrosomen	14
2.3.6.	Extraktion aus Inkubationsgemisch	14
2.3.7.	Dünnschichtchromatographische Bestimmung der Metaboliten	15
2.3.7.1.	Trennung der Metaboliten	15
2.3.7.2.	Messung und Auswertung	16
2.3.8.	Identifizierung der Metaboliten	16
2.3.8.1.	Chromatographische R_F-Werte	16
2.3.8.2.	UV-Spektren auf der Platte	18
2.3.8.3.	Farbreaktionen	18
2.3.9.	Wiedergewinnungsversuche	18
2.4.	Versuche in vivo mit Amitriptylin	19
2.4.1.	Versuchstiere	19
2.4.2.	Orale Gabe	19
2.4.3.	Sammlung des Harn	19
2.4.4.	Extraktion von Metaboliten aus Harn	19
2.4.4.1.	Nicht-konjugierte Metaboliten	19
2.4.4.2.	Konjugierte Metaboliten	20

		Seite
2.4.5.	Dünnschichtchromatographische Trennung	20
2.4.6.	Photometrische Messung und Auswertung	21
2.5.	Identifizierung der Metaboliten	22
2.5.1.	UV-Spektrophotometrie in Säure und in Alkali	22
2.5.2.	Chromatographische R_F-Werte	22
2.5.3.	Farbreaktionen auf dem Chromatogramm	22
2.5.4.	Chemische Reaktion	22
3.	ERGEBNISSE	
3.1.	Untersuchungen in vitro mit Amitriptylin und Nortriptylin	23
3.1.1.	Identifizierung der Metaboliten	23
3.1.1.1.	Dünnschichtchromatographische Trennung und R_F-Werte	23
3.1.1.2.	UV-Spektren	24
3.1.1.3.	Farbreaktionen auf dem Chromatogramm	25
3.1.2.	Kontrollversuche	25
3.1.2.1.	Wiedergewinnungen von Metaboliten aus Mikrosomen	25
3.1.2.2.	Ergebnisse von Doppelbestimmungen	27
3.1.3.	Einfluss der Reaktionsbedingungen auf die Bildung der Metaboliten	28
3.1.3.1.	Abhängigkeit von der Menge an Mikrosomen	28
3.1.3.2.	Abhängigkeit von der Inkubationszeit	28
3.1.3.3.	Abhängigkeit von der Substratkonzentration	31
3.1.4.	Die Wirkung der Vorbehandlung der Ratten mit Phenobarbital, ß-Naphthoflavon und Pregnenolon-16α-carbonitril	31
3.1.4.1.	Relatives Lebergewicht und mikrosomales Protein	31
3.1.4.2.	Gehalt an Cytochromen b_5 und P-450	32
3.1.4.3.	Die Bildung der Metaboliten	33
3.2.	Untersuchungen in vivo mit Amitriptylin	37
3.2.1.	Identifizierung der Metaboliten	37
3.2.1.1.	Fließmittel und R_F-Werte	37
3.2.1.2.	UV-Spektren	37

		Seite
3.2.1.3.	Farbreaktionen auf dem Chromatogramm	37
3.2.1.4.	Chemische Reaktion	37
3.2.2.	Enzymatische Hydrolyse konjugierter Metaboliten	39
3.2.3.	Nicht-konjugierte und konjugierte Metaboliten	39
3.2.4.	Untersuchungen beim Hund	39
3.2.4.1.	Metaboliten von AT im Harn	39
3.2.5.	Untersuchungen beim Kaninchen	41
3.2.5.1.	Metaboliten von AT im Harn	41
3.2.5.2.	Metaboliten von AT im Harn nach Phenobarbital-Behandlung	43
4.	DISKUSSION	44
5.	ZUSAMMENFASSUNG	49
6.	LITERATURVERZEICHNIS	52

1. EINLEITUNG

Amitriptylin (AT) und Nortriptylin (NT) sind zwei der am meisten verwendeten trizyklischen Antidepressva. Wie alle Psycho- und Neuropharmaka besitzen sie eine hohe Lipidlöslichkeit.Sie werden daher nach oraler Gabe aus dem Magen-Darm-Trakt gut resorbiert und verteilen sich im ganzen Organismus (Mc Mahon et al., 1963; Corona et al., 1968; Knapp et al., 1972; Biggs et al., 1979).

Eine Ausscheidung über die Niere in unveränderter Form ist nur in sehr geringem Ausmaß möglich. Die Bindung an Plasmaproteine beträgt für AT beim Menschen durchschnittlich 92 %, für NT 89 % (Brinkschulte & Breyer-Pfaff, 1979), so daß nur ein kleiner Anteil glomerulär filtriert werden kann. Wie bei anderen lipophilen Verbindungen erfolgt aus den Tubuli weitgehende Rückresorption. Die Pharmaka könnten also nicht ausgeschieden werden, wenn sie nicht zu hydrophileren Verbindungen umgesetzt würden.

Für die enzymatische Biotransformation lipophiler Fremdstoffe sind in erster Linie die Cytochrome P-450 verantwortlich, die im endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und dort an die lipoidhaltigen Membranen gebunden sind. Bei den Umsetzungen können unwirksame, wirksame oder schädliche Metaboliten entstehen.

Aus der Literatur geht hervor, daß AT und NT von verschiedenen Spezies in vivo metabolisiert werden können. Es wird allgemein angenommen, daß die aliphatische Hydroxylierung an den C-Atomen 10 und 11 der wichtigste metabolische Weg ist. NT wird von Ratte und Mensch zu 10-Hydroxy-nortriptylin (10-OH-NT), Desmethyl-nortriptylin (DNT) und 10-Hydroxy-DNT (10-OH-DNT) metabolisiert (Eschenhof & Rieder, 1969; Mc Mahon et al., 1963; Hammar et al., 1971; De Leenheer & Heyndrickx, 1971; Knapp et al., 1972; Bertilsson & Alexanderson, 1972; Whitnack et al., 1972). AT wird von Mensch und Hund zu NT, 10-OH-NT, 10-Hydroxy-amitriptylin (10-OH-AT), DNT, 10-OH-DNT und Amitriptylin-N-oxid (AT-NO) metabolisiert (Eschenhof & Rieder, 1969; Hucker et al., 1977; Biggs et al., 1979). Bickel (1969) berichtete, daß aus in vivo gebildetem AT-NO wieder AT entstehen kann, daß also die N-Oxidation eine umkehrbare Reaktion ist. Auf diese Weise kann AT-NO über AT bei Ratte und Mensch zu 10-OH-AT, 10-OH-NT und DNT metabolisiert werden (Breyer-Pfaff et al., 1978; Midgley et al., 1978).

Corona & Facino (1968) und Facino et al. (1970) untersuchten den Metabolismus von AT beim Kaninchen. Die Bildung von 10-OH-AT, 10,11-Dihydroxy-amitriptylin (10,11-$(OH)_2$-AT) und einem Metaboliten mit Carboxylgruppe wurde beobachtet. Die Autoren unterstrichen, daß keine phenolischen Metaboliten gebildet wurden. In einem Übersichtsartikel schrieb Bickel (1980) auch im Hinblick auf andere Spezies, daß es keinen Beweis für aromatische Hydroxylierung von AT und NT gebe. Dagegen beschrieben Hucker et al. (1977) beim Hund einen oxidativen Angriff am aromatischen Ring des AT, bei dem das 1,2-Dihydrodiol entstand. Die Bildung von Dihydrodiolen aus aromatischen Verbindungen veläuft nach heutigen Kenntnissen über Epoxide. Diese stellen reaktionsfähige Zwischenprodukte dar, die in verschiedener Weise weiterreagieren können:

1) Hydrolyse durch Epoxidhydrolase zu Dihydrodiolen;
2) Isomerisierung zu Phenolen;
3) Addition von Glutathion;
4) Reaktion mit körpereigenen Verbindungen, z.B. mit SH-Gruppen von Proteinen, dadurch kann ein Antigen gebildet werden, das zum Entstehen einer allergischen Reaktion führt.

Allergien sind bei AT-behandelten Patienten zwar selten, sie treten jedoch gelegentlich auf (Anderson & Herrikson, 1978; Morgan, 1969; Yon, 1975). Ihre Entstehung läßt sich nicht erklären, wenn AT ausschließlich durch N-Demethylierung, N-Oxidation und aliphatische Hydroxylierung in Stellung 10 und 11 metabolisiert wird.
In einer kürzlichen Untersuchung konnten Breyer-Pfaff et al. (1980) zeigen, daß auch beim Menschen und bei der Ratte in vivo oxidative Reaktionen an einem aromatischen Ring von AT bzw. NT eintreten, und zwar unter Bildung von mehreren Phenolen. Ihre Konstitution wurde durch Massenspektrometrie und NMR-Spektroskopie aufgeklärt (Abb. 1). Da von Facino et al. (1970) das Auftreten phenolischer Metaboliten im Harn AT-behandelter Kaninchen ausdrücklich verneint worden war, sollte diese Frage erneut geprüft werden. In der vorliegenden Arbeit sind Versuche zur qualitativen und quantitativen Analyse von AT-Metaboliten im Kaninchenharn beschrieben.

Der Versuch von Hucker et al. (1977) beim Hund wurde wiederholt, um die Dihydrodiole von AT und NT als Vergleichssubstanzen zu erhalten und um festzustellen, ob neben diesen auch Phenole im Harn ausgeschieden werden.

Weitere Experimente beschäftigten sich mit dem Stoffwechsel von AT und NT in vitro durch Rattenlebermikrosomen. Aus der Literatur ist bekannt, daß beide Substanzen unter diesen Bedingungen in 10-Stellung hydroxyliert und N-demethyliert werden. Von Bahr (1972) berichtete, daß die Bildung von 10-OH-NT aus NT in vitro nach Vorbehandlung der Tiere mit Phenobarbital (PB) verlangsamt war. Dem scheint ein ungewöhnlicher Typ von Induktion zugrunde zu liegen.

In den vorliegenden Experimenten wurden als Induktionsmittel PB, ß-Naphthoflavon (BF) und Pregnenolon-16α-cabonitril (PCN) verwendet. PB vermehrt selektiv eine besondere Subspezies Cytochrom P-450 (Remmer et al., 1979). BF ist ein polyzyklischer Kohlenwasserstoff, der Cytochrom P-448 in ähnlicher Weise induziert wie 3-Methylcholanthren (Boobis et al., 1977). PCN ist ein synthetisches Steroid, das Cytochrom P-450 und NADPH-Cytochrom-P-450-Reduktase induzieren kann. Das durch PCN induzierte Cytochrom P-450 unterscheidet sich von den mit PB oder BF induzierten bezüglich der Substrat-Spezifität (Lu et al., 1972).

Durch vergleichende Untersuchungen mit Mikrosomen von Kontrollratten und von Ratten, die mit den Induktionsmitteln vorbehandelt worden waren, wurde den Fragen nachgegangen, ob aromatische Hydroxylierung von AT und NT auch in vitro stattfindet, welche Mengenverhältnisse der Metaboliten im Vergleich zu den Experimenten in vivo auftreten und wie die Vorbehandlung mit Induktionsmitteln die verschiedenen metabolischen Wege, insbesondere aliphatische und aromatische Hydroxylierung, Demethylierung und N-Oxidation, beeinflußt.

ABKÜRZUNGEN

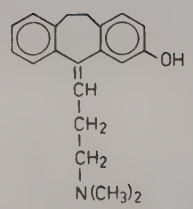
METABOLITEN VON AMITRIPTYLIN UND NORTRIPTYLIN :

AT	:	Amitriptylin
2-OH-AT	:	2-Hydroxy-amitriptylin
10-Oxo-2-OH-AT	:	10(oder 11)-Oxo-2-hydroxy-amitriptylin
2,10-$(OH)_2$-AT	:	2,10(oder 11)-Dihydroxy-amitriptylin
3,11-$(OH)_2$-AT	:	3,11(oder 10)-Dihydroxy-amitriptylin
2,10,11-$(OH)_3$-AT	:	2,10,11-Trihydroxy-amitriptylin
10-OH-AT	:	10-Hydroxy-amitriptylin
10,11-$(OH)_2$-AT	:	10,11-Dihydroxy-amitriptylin
OH-OCH_3-AT	:	2-Hydroxy-3-methoxy(oder 3-Hydroxy-2-methoxy)-amitriptylin
3-OH-10,11-Dehydro-AT	:	3-Hydroxy-10,11-dehydro-amitriptylin
AT-NO	:	Amitriptylin-N-oxid
10-OH-AT-NO	:	10-Hydroxy-amitriptylin-N-oxid
AT-DHD	:	Amitriptylin-1,2-dihydrodiol
NT	:	Nortriptylin
2-OH-NT	:	2-Hydroxy-nortriptylin
10-Oxo-2-OH-NT	:	10(oder 11)-Oxo-2-hydroxy-nortriptylin
2,10-$(OH)_2$-NT	:	2,10(oder 11)-Dihydroxy-nortriptylin
E-10-OH-NT	:	10-Hydroxy-nortriptylin, E-Isomer
Z-10-OH-NT	:	10-Hydroxy-nortriptylin, Z-Isomer
10,11-$(OH)_2$-NT	:	10,11-Dihydroxy-nortriptylin
NT-DHD	:	Nortriptylin-1,2-dihydrodiol
DNT	:	Desmethyl-nortriptylin

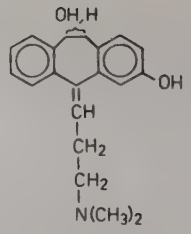
SONSTIGE ABKÜRZUNGEN :

BF	:	ß-Naphthoflavon
$CHCl_3$	:	Chloroform
EDTA	:	Äthylendiamintetraessigsäure-Na_2
i.p.	:	intraperitoneal
NADH	:	Nicotinamid-adenindinucleotid, reduziert
NADPH	:	Nicotinamid-adenindinucleotidphosphat, reduziert
NADP-Na_2	:	Nicotinamid-adenindinucleotidphosphat, oxidiert

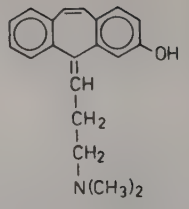
PB	:	Phenobarbital
PCN	:	Pregnenolon-16α-carbonitril
p.o.	:	per os
Tris	:	Tris-(hydroxymethyl)-amino-methan



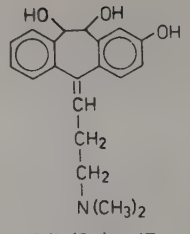
3-OH-AT



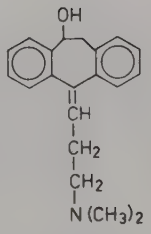
3,10-$(OH)_2$-AT



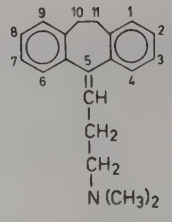
3-OH-10,11-Dehydro-AT



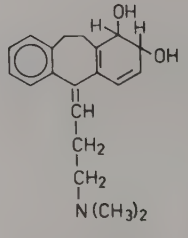
2,10,11-$(OH)_3$-AT



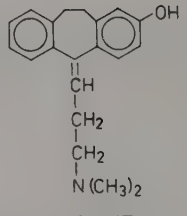
10-OH-AT



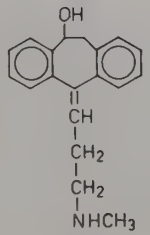
AT



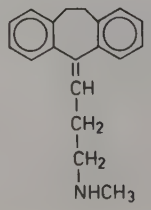
AT-DHD



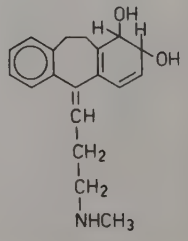
2-OH-AT



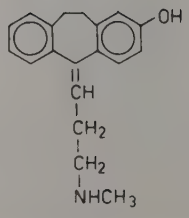
10-OH-NT



NT



NT-DHD



2-OH-NT

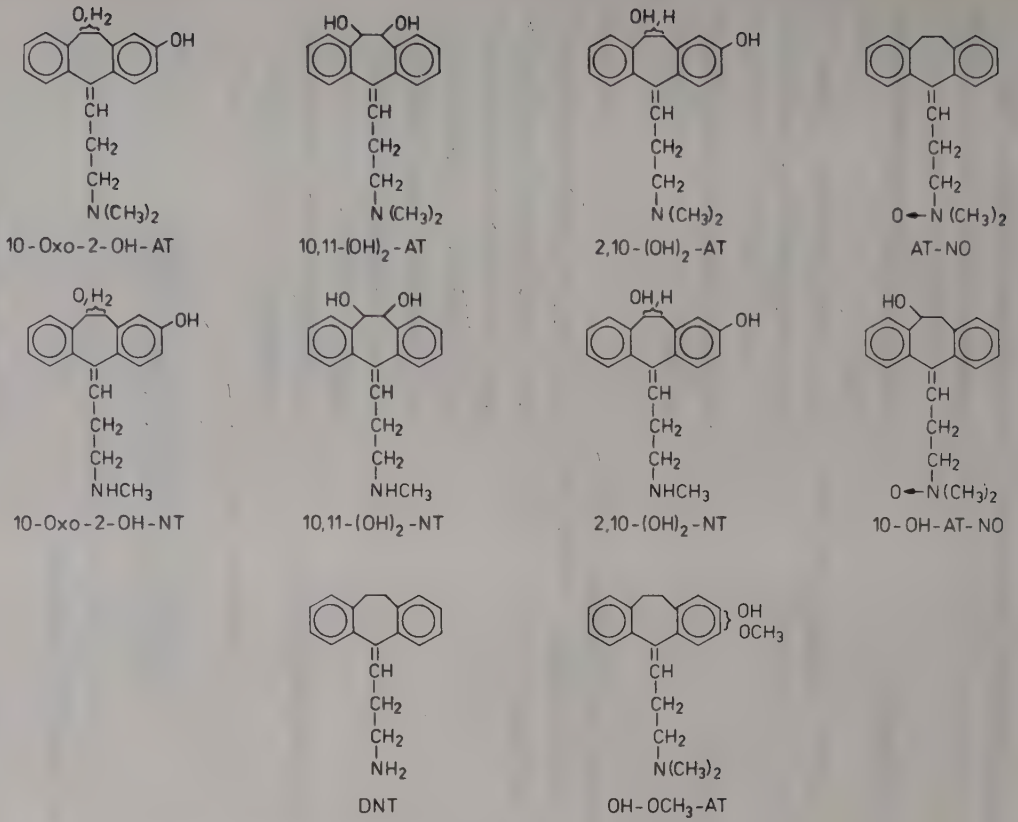


Abb. 1. Strukturformeln der Phamaka Amitriptylin und Nortriptylin und ihrer Metaboliten

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. GERÄTE

Homogenisation für Mikrosomenpräparation	:	Potter-Elvehjem aus Plexiglas Elektromotorenantrieb (Janke & Kunkel)
Zentrifugation	:	Christ Laborzentrifuge, HC 162 Labofuge III
für 10 000 g	:	Sorvall-Kühlzentrifuge
für 100 000 g	:	Spinco-Ultrazentrifuge, Modell L
Eindampfen	:	Rotationsverdampfer, Büchi, Flawil (Schweiz)
Photometrische Messungen	:	
klare Lösungen	:	Zeiss PMQ II Spektralphotometer
DC-Platten	:	Zeiss Chromatogramm-Spektralphotometer M 4 III in Verbindung mit PMQ II (Carl Zeiss, Oberkochen) und einem Potentiometerschreiber (linear) Servogor S (Metrawatt, Nürnberg)
Mikrosomensuspension	:	Leitz Unicam SP 800, UV-Spektralphotometer

2.2. SUBSTANZEN UND CHROMATOGRAPHIE-MATERIAL

Die Substanzen wurden von folgenden Firmen oder Personen zur Verfügung gestellt bzw. bezogen:

AT·HCl; NT·HCl	:	Troponwerke (Köln)
10-OH-AT		
AT-NO		
E-10-OH-NT		

Z-10-OH-NT		
DNT	:	A.Jørgensen, Lundbeck & Co. (København, Dänemark)
Alle übrigen Metaboliten außer AT-DHD und NT-DHD	:	U.Breyer-Pfaff, Tübingen
BF	:	EGA-Chemie (Steinheim)
β-Glucuronidase/Arylsulfatase		
Isocitratdehydrogenase		
NADH		
$NADP\text{-}Na_2$	:	Boehringer & Soehne (Mannheim)
EDTA		
Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz		
Phenobarbital-Na		
Saccharose		
Tris		
Tween 80	:	E. Merck (Darmstadt)
Rinderserumalbumin	:	Behringwerke AG (Marburg)
PCN	:	Schering (Berlin)
Kieselgelfolien, Polygram Sil G/UV_{254}, mit Fluoreszenzindikator, 20x20 cm, 0,25 mm Schichtdicke	:	Macherey-Nagel (Düren)
DC-Fertigplatten, Kieselgel 60, ohne Fluoreszenzindikator, 20x20 cm, 0,25 mm Schichtdicke		E. Merck (Darmstadt)

Die organischen Lösungsmittel waren chemisch rein und wurden vor Gebrauch destilliert.

2.3. VERSUCHE IN VITRO MIT AMITRIPTYLIN UND NORTRIPTYLIN

2.3.1. BEHANDLUNG DER TIERE

Es wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 300 g verwendet. Sie erhielten Labor-Standard-Futter (Altromin R, Altromin GmbH, Lage) und Leitungswasser ad libitum. Das Futter wurde 12 Stunden vor dem Versuch entzogen.

2.3.1.1. PHENOBARBITAL

Phenobarbital wurde mit der Schlundsonde per os gegeben. Die Dosierung betrug 50 mg/kg Körpergewicht, gelöst in 5 ml/kg Aqua bidest., zweimal pro Tag. 36 Stunden nach der 9. Behandlung mit PB wurden die Ratten decapitiert.

2.3.1.2. PREGNENOLON-16α-CARBONITRIL

Pregnenolon-16α-carbonitril wurde mit der Schlundsonde per os gegeben. Die Dosierung betrug 30 mg/kg Körpergewicht, suspendiert in 5 ml/kg Aqua bidest. mit einem Tropfen Tween 80, zweimal pro Tag, insgesamt 5mal. Die Ratten wurden 24 Stunden nach der letzten Behandlung decapitiert.

2.3.1.3. β-NAPHTHOFLAVON

Die Ratten bekamen eine einmalige Dosis β-Naphthoflavon i.p.(80 mg/kg in 5 ml/kg Maisöl gelöst) 48 Stunden vor Versuchsbeginn.

2.3.2. PRÄPARATION VON MIKROSOMEN

Die Ratten wurden durch Genickschlag getötet, ausgeblutet, die Lebern herauspräpariert, gewogen und in eiskalte 0,9 % Kochsalzlösung gelegt. Die Lebern wurden mit der Schere zerkleinert und dreimal mit 0,9 % Kochsalzlösung und einmal mit Saccharose-Tris-EDTA-Lösung (0,25 M Saccharose,enthaltend 20 mM Tris-HCl und 5,4 mM EDTA-Na_2, pH 7,4)(Netter, 1960) gewaschen.

Saccharose-Tris-EDTA-Lösung:

85,9 g Saccharose
2,4 g Tris
2,0 g EDTA

mit 1 N HCl auf pH 7,4 eingestellt, Aqua bidest. ad 1 l

Je 5 g Lebergewebe wurden mit 28 g Saccharose-Tris-EDTA-Lösung im Potter-Elvehjem homogenisiert.
Das Homogenat wurde 10 min bei 10 000 Upm (12 000 g) in einer Sorvall-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand wurde in kleine Röhrchen verteilt und in einem vorgekühlten Rotor 50 in der Spinco-Ultrazentrifuge zentrifugiert (60 min bei 40 000 Upm = 100 000 g). Die sedimentierten Mikrosomen jeder Leber wurden wieder in Saccharose-Tris-EDTA-Lösung suspendiert und noch einmal bei 40 000 Upm ultrazentrifugiert. Die gewaschenen Mikrosomen wurden in ca. 10 ml Saccharose-Tris-EDTA-Lösung homogenisiert und suspendiert, was eine Eiweisskonzentration von ca. 10 mg Protein pro ml Suspension ergab.
Alle Arbeiten wurden im Temperaturbereich von 0 - 4°C ausgeführt.

2.3.3. EIWEISSBESTIMMUNG

Es wurde nach dem Verfahren von Lowry et al.(1951) mit Rinderserumalbumin (1 mg/ml) als Standard vorgegangen. Bei jeder Eiweissbestimmung wurde erneut eine Eichkurve angefertigt.
Die Mikrosomensuspension wurde mit Aqua bidest. 10- bis 15fach verdünnt, je Probe wurden 3 Ansätze (mit steigender Proteinmenge) bestimmt.
Pro Ansatz:

Mikrosomen-Verdünnung (0,05 - 0,15 mg Protein)
oder Protein-Standard (40 - 140 µl)
und Aqua bidest. ad 0,3 ml
0,3 ml 1 N NaOH
(30 min stehenlassen)
3 ml alkalisches Cu-Reagenz, bestehend aus:
100 Teile 2 % Na_2CO_3-Lösung
1 Teil 2,7 % K-Na-Tartrat-Lösung
1 Teil 1 % $CuSO_4 \cdot 5H_2O$-Lösung

(10 min stehenlassen)

0,3 ml 1:1 verdünntes Folin-Ciocalteus-Reagenz

(unter Schütteln zugeben, 90 min stehenlassen)

Es wurde die Extinktion im sichtbaren Licht (720 nm) photometrisch bestimmt und aus der Eichkurve die Proteinkonzentration der Mikrosomensuspension ermittelt.

2.3.4. MESSUNG DER CYTOCHROME b_5 UND P-450

Die Cytochrome b_5 und P-450 konnten in einem Ansatz mit Hilfe von Differenzspektren gemessen werden (Omura & Sato, 1964).
Cytochrom b_5 wird durch NADH reduziert, bindet jedoch kein CO, Cytochrom P-450 reagiert dagegen mit CO, wird nur langsam durch NADH, aber sehr schnell durch Natriumdithionit reduziert.
Die Mikrosomensuspension wurde so mit KCl-Tris-Puffer (1,15 % KCl-Lösung : 0,25 M Tris-HCl-Puffer pH 7,4 = 4 : 1) verdünnt, daß eine Suspension von ca. 1 mg Protein/ml entstand.

Meßansatz

I. Cytochrom b_5

	Meßküvette	Kontrollküvette
Mikrosomensuspension	0,5 ml	0,5 ml
KCl-Tris-Puffer	2,5 ml	2,5 ml
NADH (20 mg/ml)	0,02 ml	-

Meßansatz gut mischen und das Spektrum von 380 nm bis 530 nm messen.

II. Cytochrom P-450

Zusätzlich zu Meßansatz I:	Meßküvette	Kontrollküvette
CO 20 sec lang	+	-
einige Körnchen $Na_2S_2O_4$	+	+

Meßansatz mischen und das Spektrum von 380 nm bis 530 nm messen.

Für Cytochrom b_5 wurde die Differenz

$E_{424} - E_{409}$ zur Auswertung bestimmt:

$\Delta E = 1{,}000 \triangleq 5{,}4$ nmol/ml

Für Cytochrom P-450 wurde die Differenz

$E_{450} - E_{490}$ zur Auswertung bestimmt:

$\Delta E = 1{,}000 \triangleq 11{,}0$ nmol/ml

Zugrundegelegt wurden 1,0 mg Protein/ml.
Deshalb ist der Faktor f (nmol·mg Protein^{-1})

für Cytochrom b_5 - 5,4,

für Cytochrom P-450 - 11,0.

Die Faktoren errechnen sich aus den molaren Extinktionskoeffizienten (Omura & Sato, 1964):

für Cytochrom b_5 - 185 $cm^{-1}mM^{-1}$ (409 - 424 nm),

für Cytochrom P-450 - 91 $cm^{-1}mM^{-1}$ (450 - 490 nm).

2.3.5. INKUBATION MIT LEBERMIKROSOMEN

Die Ansätze hatten folgende Zusammensetzung pro 2 ml:

Mikrosomales Protein		4 mg
Saccharose-Tris-EDTA-Lösung	ad	0,79 ml
0,25 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,4		0,4 ml
Cofaktoren-Lösung:		0,4 ml
1,6 mg NADP-Na_2 (1 µmol)		
4,7 mg Isocitrat-Na (8 µmol)		
in KCl-Tris Puffer		
0,1 M $MgCl_2$ Lösung		0,2 ml
Isocitratdehydrogenase		0,01 ml

Nach einer Vorinkubation von 5 min unter Schütteln wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,2 ml 5 mM Substratlösung pro Ansatz gestartet. Nach weiteren 5 min (für AT) oder 10 min (für NT) Inkubationszeit wurde die Reaktion abgebrochen durch Zugabe von 0,3 ml 25 % NH_3-Lösung.
Für Kontrollversuche wurden die folgenden Parameter geändert:

Mikrosomales Protein — 2, 6 oder 8 mg
Inkubationszeit — bis 30 min
Substratkonzentration — 0,05 - 0,5 mM

Bei Verwendung von Substratkonzentrationen unter 0,5 mM wurden Ansätze von 5 ml mit entsprechender Erhöhung aller Zusätze hergestellt, die Inkubationszeit betrug nur 3 min.

2.3.6. EXTRAKTION AUS DEM INKUBATIONSGEMISCH

Zu dem Inkubationsansatz wurden 2 ml $CHCl_3$ und 20 µl 10 % Na-deoxycholat-Lösung (für bessere Phasentrennung) hinzugefügt. Die Probe wurde kräftig 1 min geschüttelt und bei 4 500 Upm zentrifugiert. Die organische Phase wurde mit einer Pasteur-Pipette herausgesaugt. Die Extraktion wurde mit 2 ml $CHCl_3$ wiederholt.
Die organische Phase wurde in ein 15 ml-Zentrifugenglas gegeben, an

dessen Wand mitgenommene Spuren der wäßrigen Phase hängenblieben. Anschließend wurde die Probe in einem anderen 15 ml-Zentrifugenglas durch Überblasen von Stickstoff bei 30°C eingedampft. Der Extrakt wurde bei -20°C aufbewahrt.

2.3.7. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE BESTIMMUNG DER METABOLITEN

2.3.7.1. TRENNUNG DER METABOLITEN

Der Extrakt wurde in wenig $CHCl_3$ gelöst und in ein kleines Schliffglas übergeführt. Das erste Glas wurde zweimal mit $CHCl_3$ nachgewaschen, und die vereinigten Lösungen wurden eingedampft. Zur Trennung und quantitativen Bestimmung der Metaboliten wurden Fertigplatten verwendet (Kieselgel 60 ohne Fluoreszenzindikator), die direkt photometriert wurden. Vor Gebrauch wurden die Platten in Methanol : 25 % NH_3 (30:1,5) gewaschen. Der Extrakt wurde in einer definierten Menge Benzol (40 - 200 µl) gelöst und davon ein aliquoter Teil (E-10-OH-NT 2 %;Z-10-OH-NT, 2-OH-NT 20 %; DNT 10 %; 10-OH-AT, AT-NO, NT 4 %; 2-OH-AT 25 %) mit Kapillarpipetten (Brand, Wertheim) punktförmig auf die Startlinie aufgetragen. Gleichzeitig wurden entsprechende Mengen Vergleichssubstanzen auf die gleiche Platte zur Anfertigung einer Eichkurve aufgetragen. Die Startlinie lag 2,0 cm über dem unteren Plattenrand.Die Startpunkte hatten Abstände von 1,5 cm voneinander. Nach Trocknen wurde die Platte in Chloroform : Isopropanol = 20 : 2 gestellt und bis zum oberen Plattenrand laufen gelassen. Dabei werden mitextrahierte Lipide in das obere Drittel der Platte bewegt, während die Pharmaka und ihre Metaboliten nahe beim Startpunkt bleiben. Es wurde 10 min getrocknet, und die Chromatogramme wurden in den verschiedenen Fließmitteln bis zu einer Höhe von 12 cm oberhalb der Startlinie entwickelt. Danach wurden die Platten 30 min an der Luft getrocknet. Die Mengen an Vergleichssubstanzen zur Anfertigung der Eichkurven betrugen ca. 0,5 - 5 nmol. Sie wurden aus Lösungen in Benzol oder $CHCl_3$ (für AT-NO) entnommen, die 0,2 - 1 nmol/µl enthielten. Der Gehalt der Lösungen wurde kontrolliert durch Abnahme von 30 - 100 µl mit Konstriktionspipetten, Eindampfen und Messung in 3 ml 0,1 N H_2SO_4 bei 2 Wellenlängen.

Zur Auswertung wurden die Extinktionsdifferenzen herangezogen, die in Tab. 1 zusammengestellt sind.

2.3.7.2. MESSUNG UND AUSWERTUNG

Die Platten wurden nach dem Trocknen mit dem Zeiss-Chromatogramm-Spektralphotometer nach dem Prinzip der Remissionsphotometrie ausgewertet.

Folgende Einstellungen wurden gewählt:

Wellenlänge	240 nm
Spaltbreite	2 mm
Verstärkung	10/5/1/A
Schreiber	10 mV

Die Platten ließ man in Richtung des Fließmittels durchlaufen und ermittelte durch seitliches Verschieben von je 1 mm die genaue Lage des Flecks (maximale Größe des Peaks). Aus dem Produkt von Peakhöhe und Halbwertsbreite wurde die Peakfläche errechnet. Die Flächen der Vergleichssubstanzen wurden gegen die eingesetzten Mengen aufgetragen und ergaben so die Eichkurve.

2.3.8. IDENTIFIZIERUNG DER METABOLITEN

2.3.8.1. CHROMATOGRAPHISCHE R_F-WERTE

Die R_F-Werte in verschiedenen Fließmitteln sind in Tab. 2 aufgeführt. Für die Metaboliten aus NT wurde eine zweidimensionale Chromatographie durchgeführt mit Fließmittel A_1 in der ersten und mit Fließmittel B, Chloroform : Isopropanol : Wasser : 25 % NH_3 (12 : 9 : 0,4 : 0,15), in der zweiten Richtung (Abb. 2).

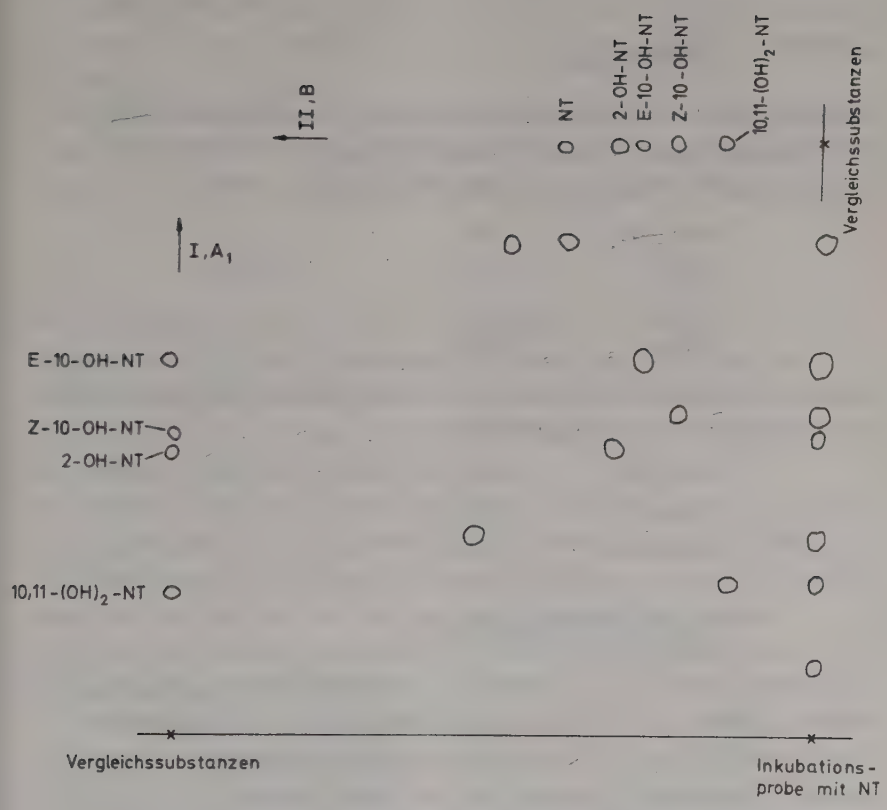


Abb. 2. Zweidimensionale Chromatographie für die Metaboliten von NT.

2.3.8.2. UV-SPEKTREN AUF DER PLATTE

Bei der Registrierung der Peaks wurde die Wellenlänge zwischen 215 und 315 nm in Schritten von 5 nm variiert. Aus den Peakhöhen ließ sich ein UV-Spektrum aufzeichnen und mit dem der authentischen Substanz vergleichen.

2.3.8.3. FARBREAKTIONEN

Substituenten im trizyklischen System machen sich durch unterschiedliche Färbungen bemerkbar, wenn das Chromatogramm nach Besprühen mit dem folgenden Reagenz 5 min auf 100°C erhitzt wird:

$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0,8 g
H_2O	10 ml
H_2SO_4	10 ml
Äthanol	60 ml

N-Demethylierungen erkennt man an violetten bzw. orangefarbenen Flekken beim Erhitzen nach Besprühen mit

Ninhydrin	150 mg
Eisessig	1,5 ml
n-Butanol	50 ml

2.3.9. WIEDERGEWINNUNGSVERSUCHE

Die Wiedergewinnung von E-10-OH-NT, Z-10-OH-NT, 2-OH-NT, DNT, NT, 10-OH-AT, 2-OH-AT und AT-NO bei der Aufarbeitung von Mikrosomenansätzen wurde ermittelt, indem Lösungen bekannter Mengen der Substanzen zu Mikrosomen zugesetzt und die Proben analog 2.3.5., 2.3.6. und 2.3.7. aufgearbeitet wurden. Durch Vergleich mit den eingesetzten Mengen ergaben sich die Wiedergewinnungsquoten. Damit wurden die Versuchsergebnisse korrigiert.

2.4. VERSUCHE IN VIVO MIT AMITRIPTYLIN

2.4.1. VERSUCHSTIERE

Es wurden drei junge männliche Kaninchen (Rasse: Weiße Neuseeländer) mit einem Körpergewicht von 2,4 - 2,5 kg und ein männliches Kaninchen unbekannter Rasse mit einem Körpergewicht von 4,6 kg verwendet. Sie erhielten Labor-Standard-Futter (Brand-Purina) und Leitungswasser ad libitum.
Es wurde ein weiblicher reinrassiger Beaglehund mit einem Körpergewicht von 16 kg verwendet. Fütterung erfolgte mit Labor-Standard-Futter (Altromin H), während des Versuchs auch mit Milch.

2.4.2. ORALE GABE

Den Kaninchen wurde AT mit der Schlundsonde per os gegeben. Die Dosierung betrug 20 mg/kg Körpergewicht, gelöst in 10 ml Aqua dest., und die Schlundsonde wurde anschließend mit ca. 5 ml Wasser gespült. Dem Hund wurde AT in einer Gelatinekapsel per os gegeben. Die Dosierung betrug 5 mg/kg Körpergewicht.
Das Mischrasse-Kaninchen wurde für einen Induktionsversuch verwendet. Vier Wochen nach der ersten AT-Gabe wurde dem Trinkwasser 7 Tage lang 0,1 % Na-Phenobarbital zugesetzt. Nach der Menge, die das Kaninchen getrunken hat, betrug die Dosierung ca. 35 mg/kg/Tag, insgesamt 280 mg/kg. 24 Stunden nach Absetzen von PB wurde AT wieder in derselben Dosierung (20 mg/kg) per os gegeben.

2.4.3. SAMMLUNG DES HARN

Jedes Tier wurde getrennt in einem Stoffwechsel-Käfig gehalten. Der Harn wurde in 24 h-Portionen gesammelt bis 72 h. Außerdem wurde von einem unbehandelten Kaninchen Leerharn gewonnen.

2.4.4. EXTRAKTION VON METABOLITEN AUS HARN

2.4.4.1. NICHT-KONJUGIERTE METABOLITEN

Die Harnproben wurden konzentriert durch abwechselndes Einfrieren bei -20°C und langsames Auftauen ohne Vermischung. Nach 3 - 4 solchen Behandlungen befindet sich im unteren Teil der Flasche ein stark konzentrierter Harn, während darüber eine kaum gefärbte wäßrige Phase steht, die verworfen werden kann.
Die Proben wurden mit 1 N NaOH auf pH 9 eingestellt und zweimal mit dem gleichen Volumen $CHCl_3$ extrahiert. Nach Zentrifugation bei 4 500 Upm wurde die organische Phase herausgesaugt und in einen Rundkolben mit Schliff filtriert. Die vereinigten $CHCl_3$-Phasen wurden bei einer Badtemperatur von 35°C und bei vermindertem Druck im Wasserstrahlvakuum am Rotationsverdampfer eingedampft.
Der Verdampfungsrückstand enthielt die nicht-konjugierten Metaboliten.

2.4.4.2. KONJUGIERTE METABOLITEN

Nach Extraktion der nicht-konjugierten Metaboliten wurden die Proben mit 1 N CH_3COOH auf pH 5,5 eingestellt und β-Glucuronidase/Arylsulfatase (5,2 + 2,6 U/ml, 1 ml zu 100 ml Harn) hinzugefügt. Dann wurden die Proben 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 1 N NaOH wieder auf pH 9 eingestellt und die Extraktion wiederholt.
Der Verdampfungsrückstand enthielt die aus konjugierten Metaboliten freigesetzten Alkohole und Phenole.

2.4.5. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG

Der Verdampfungsrückstand wurde auf eine DC-Fertigfolie mit Fluoreszenzindikator (Sil G/UV_{254}) aufgetragen. Zur Entfernung der Lipide wurde die Folie in Chloroform : Isopropanol (20 : 2) bis zum oberen Rand laufen gelassen. Nach 10-minütigem Trocknen kam sie zur endgültigen Trennung der Metaboliten ins nächste Fließmittel und wurde zu einer Höhe von 14 cm über der Startlinie entwickelt. Zur ersten Trennung diente Fließmittel B, und die Reinigung erfolgte für die unteren Banden in Fließmittel A_1, für die oberen in A_2. Waren die Substanzen danach noch nicht einheitlich, so schloß sich eine dritte Chromatographie in C an (Tab. 2).

Die Platte wurde 3 min im Abzug getrocknet, und unter Licht von 254 nm wurden die UV-absorbierenden Banden markiert. Nach Besprühen der Platte mit Aqua bidest. konnte das Gel der Banden mit einem Spatel abgehoben und in einem 15 ml-Zentrifugenglas in 1 ml 2 N NH_3 aufgeschwemmt werden. Die Metaboliten wurden in 2 ml $CHCl_3$ extrahiert. Die Probe wurde 1 min lang geschüttelt und zentrifugiert. Die organische Phase wurde abpipettiert. Die Extraktion mit $CHCl_3$ wurde noch einmal wiederholt und die organische Phase vereinigt und eingedampft.

2.4.6. PHOTOMETRISCHE MESSUNG UND AUSWERTUNG

Der Verdampfungsrückstand wurde in 3 ml 0,1 N H_2SO_4 gelöst und die Extinktion bei 225 - 390 nm gemessen. Die zur Auswertung benutzten Wellenlängen und die spezifischen Extinktionsdifferenzen der verschiedenen Metaboliten gehen aus Tab. 1 hervor (Breyer-Pfaff, persönliche Mitteilung).

Tab. 1. Zur Auswertung herangezogene Extinktionsdifferenzen der Substanzen bei Messung in 3 ml 0,1 N H_2SO_4 :

Substanzen	$\lambda_1 - \lambda_2$ (nm)	ΔE für 1 µmol/3 ml
AT, NT	240 - 260	3,5
10-OH-AT (-NT)	240 - 260	3,35
2-OH-AT (-NT)	250 - 280	3,05
2,10-$(OH)_2$-AT (-NT)	250 - 280	3,1
10,11-$(OH)_2$-AT (-NT)	240 - 260	3,5
AT-NO	240 - 260	3,15
OH-OCH_3-AT	290 - 310	1,4
3,11-$(OH)_2$-AT	290 - 330	0,68
3-OH-AT	250 - 280	2,7

Fur AT-DHD und NT-DHD konnte die spezifische Extinktion nicht direkt bestimmt werden. Wegen der Ähnlichkeit ihrer Spektren mit denen von

2-OH-AT und 2-OH-NT im alkalischen Milieu wird angenommen, daß auch die molaren Extinktionen gleich sind. Auf der Grundlage dieser Annahme ergibt sich ein $E_{280-300}$ von 1,6 für 1 µmol/3 ml 0,1 N H_2SO_4.

2.5. IDENTIFIZIERUNG DER METABOLITEN

2.5.1. UV-SPEKTROPHOTOMETRIE IN SÄURE UND IN ALKALI

Nach der Messung des Spektrum in 0,1 N H_2SO_4 (siehe 2.4.6.) wurde jeder Küvette 0,1 ml 5 N NaOH zugesetzt und das Spektrum erneut gemessen.

2.5.2. CHROMATOGRAPHISCHE R_F-WERTE

Bei der Trennung der Metaboliten wurden Vergleichssubstanzen mitlaufen gelassen, mit deren Hilfe die Zuordnung erfolgte. Die gereinigten Verbindungen wurden nochmals in 3 Fließmitteln mit den authentischen Substanzen verglichen, wobei anschließend Farbreaktionen durchgeführt wurden. Die R_F-Werte sind in Tab. 11 zusammengefaßt.

2.5.3. FARBREAKTIONEN AUF DEM CHROMATOGRAMM

Zur Durchführung s. 2.3.8.3. Die entstehenden Farben enthält Tab. 11.

2.5.4. CHEMISCHE REAKTION

NT-DHD, das aus Hundeharn isoliert worden war, wurde mit 1 N HCl bei 37°C 2 h inkubiert. Danach wurde die Probe mit 1 N NaOH auf pH 9 eingestellt und zweimal mit 2 ml $CHCl_3$ extrahiert. Die organische Phase wurde herausgesaugt und eingedampft. Die UV-Spektren des Verdampfungsrückstands wurden in Säure und in Alkali gemessen (s. 2.4.6. und 2.5.1.), und das chromatographische Verhalten der Substanz wurde mit dem von 2-OH-NT verglichen.

3. ERGEBNISSE

3.1. VERSUCHE IN VITRO MIT AMITRIPTYLIN UND NORTRIPTYLIN

3.1.1. IDENTIFIZIERUNG DER METABOLITEN

3.1.1.1. DÜNNSCHICHTCHROMATOGRAPHISCHE TRENNUNG UND R_F-WERTE

Beispiele für photometrische Kurven von Dünnschichtchromatogrammen sind dargestellt in Abb. 3. Die Peaks der Metaboliten stimmten im R_F-Wert mit denen der Vergleichssubstanzen überein. Die R_F-Werte sind in Tab. 2 gezeigt.

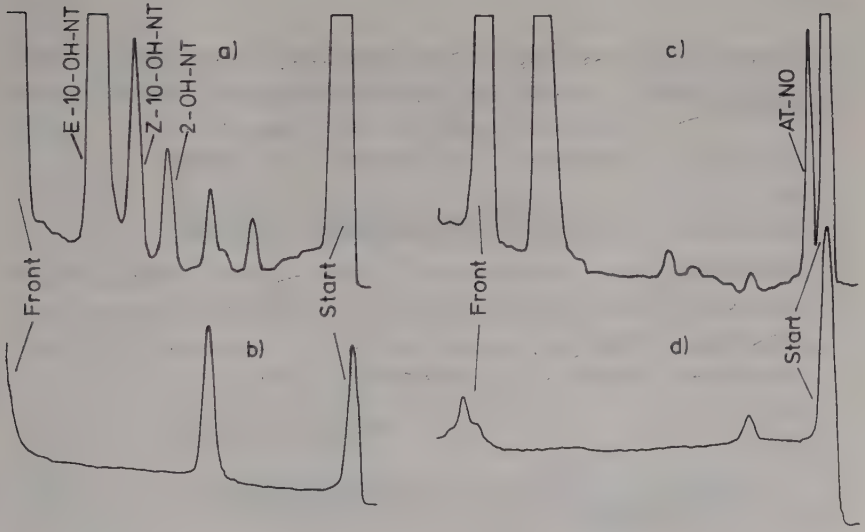


Abb. 3. Photometrische Aufzeichnung von Dünnschichtchromatogrammen bei 240 nm. a) Extrakt aus einer Inkubation von Mikrosomen mit NT; b) Extrakt aus einer Inkubation von Mikrosomen ohne Substrat; c) Extrakt aus einer Inkubation von Mikrosomen mit AT; d) Extrakt aus einer Inkubation von Mikrosomen ohne Substrat. Fließmittel: A_1 für a) und b); A_2 für c) und d).

Tab. 2. R_F-Werte der Metaboliten von AT und NT in den verwendeten Fließmitteln (DC-Fertigplatten ohne Fluoreszenzindikator)

Substanzen	A_1	A_2	C	D
E-10-OH-NT	0,71			
Z-10-OH-NT	0,63			
2-OH-NT	0,56			
AT-NO		0,06		
2-OH-AT		0,55		
NT			0,29	
10-OH-AT			0,42	
DNT				0,79

Fließmittel:

A_1 Chloroform : Isopropanol : 25 % Ammoniak (in Rinne)
20 : 2 : 3

A_2 Chloroform : Isopropanol : 25 % Ammoniak (in Rinne)
20 : 0,5 : 3

C Chloroform : Isopropanol : Wasser : 25 % Ammoniak
10 : 10 : 1 : 0,1

D Chloroform : Aceton : 25 % Ammoniak (in Rinne)
20 : 0,7 : 3

3.1.1.2. UV-SPEKTREN

Die auf der Platte gemessenen Spektren der getrennten Metaboliten und der entsprechenden Vergleichssubstanzen erwiesen sich als identisch. Als Beispiel sind die Spektren von 2-OH-AT dargestellt (Abb. 4).

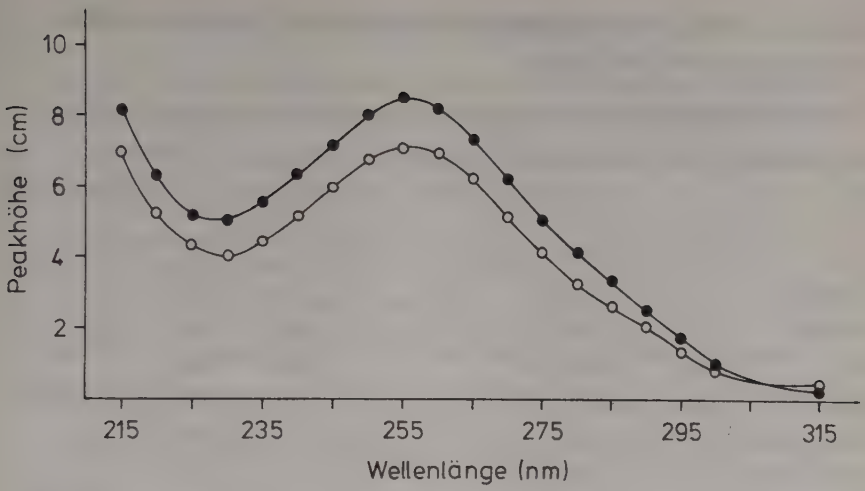


Abb. 4. UV-Spektren von 2-OH-AT bei Messung durch Reflexionsphotometrie auf dem Dünnschichtchromatogramm. ●——● Vergleichssubstanz; o——o Metabolit aus Mikrosomeninkubation.

3.1.1.3. FARBREAKTIONEN AUF DEM CHROMATOGRAMM

Die Metaboliten färbten sich auf den DC-Fertigplatten ohne Fluoreszenzindikator genau so wie auf den Folien mit Sprühreagentien (Tab. 10) und ergaben die gleichen Farben wie Vergleichssubstanzen.

3.1.2. KONTROLLVERSUCHE

3.1.2.1. WIEDERGEWINNUNGEN VON METABOLITEN AUS MIKROSOMEN

Die Wiedergewinnungsquoten von AT- und NT-Metaboliten lagen zwischen 79 und 104 % (Tab. 3). Im benutzten Bereich zeichnete sich keine Abhängigkeit der Wiedergewinnungsrate von der eingesetzten Menge ab (Abb. 5).

Tab. 3. Wiedergewinnungen der Metaboliten von AT und NT aus Mikrosomensuspensionen von Ratten

Metaboliten	n	Wiedergewinnung (%) ($\bar{X} \pm S_x$)	Bereich (nmol)
10-OH-AT	4	93 ± 9	7,5 - 20
AT-NO	5	79 ± 9	10 - 40
NT	3	104 ± 6	60 - 100
2-OH-AT	4	88 ± 4	1,5 - 6
E-10-OH-NT	4	94 ± 4	20 - 80
Z-10-OH-NT	4	90 ± 3	5 - 15
2-OH-NT	4	80 ± 4	2,5 - 10
DNT	4	91 ± 1	5 - 20

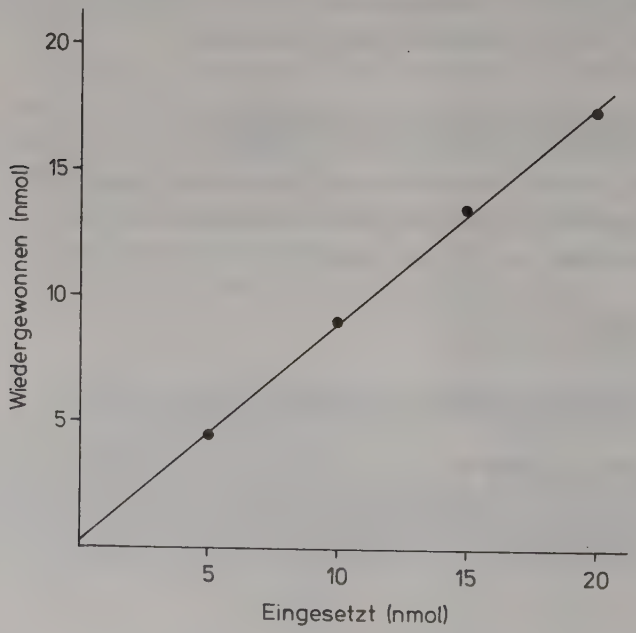


Abb. 5. Wiedergewinnung von DNT aus Rattenlebermikrosomen.

3.1.2.2. ERGEBNISSE VON DOPPELBESTIMMUNGEN

Die meisten Proben wurden doppelt inkubiert und gemessen. Die Abweichungen betrugen zwischen 0 und 30 %, und die Variationskoeffizienten lagen bei 6 - 12 %. Die Ergebnisse der Doppelbestimmungen von E-10-OH-NT werden als Beispiel in Tab. 4 gezeigt.

Tab. 4. Doppelbestimmungen von E-10-OH-NT
(nmol·mg Protein^{-1}·min^{-1})

Doppelbestimmungen	Mittelwert	% Abweichung
2,74/2,71	2,73	1,1
2,04/2,15	2,1	5,2
1,48/1,65	1,57	10,9
1,64/1,75	1,69	5,3
1,73/1,82	1,78	5,1
1,55/1,72	1,64	10,0
0,88/0,94	0,91	6,6
0,6 /0,67	0,64	11,0
2,09/2,06	2,08	1,5
1,55/1,56	1,56	0,6
1,56/1,52	1,54	1,3
1,81/1,86	1,84	2,7
0,57/0,59	0,58	3,5
0,77/0,7	0,74	9,5
0,95/1,0	0,98	5,1
1,39/1,38	1,39	0,7

Variationskoeffizient (V.K.) für E-10-OH-NT $= \sqrt{\frac{\Sigma \text{Abw.}^2}{n}} = 6{,}2\ \%$

3.1.3. EINFLUSS DER REAKTIONSBEDINGUNGEN AUF DIE BILDUNG DER METABOLITEN

3.1.3.1. ABHÄNGIGKEIT VON DER MENGE AN MIKROSOMEN

Bei den Inkubationen mit verschiedenen Mengen von Mikrosomen (1 - 4 mg Protein/ml Inkubationsansatz) waren die gebildeten Metabolitenmengen proportional zu der Menge der Mikrosomen (Abb. 6).

3.1.3.2. ABHÄNGIGKEIT VON DER INKUBATIONSZEIT

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 7, 8 zusammengefaßt. Außer NT zeigten alle Metaboliten annähernd konstante Bildungsgeschwindigkeiten.

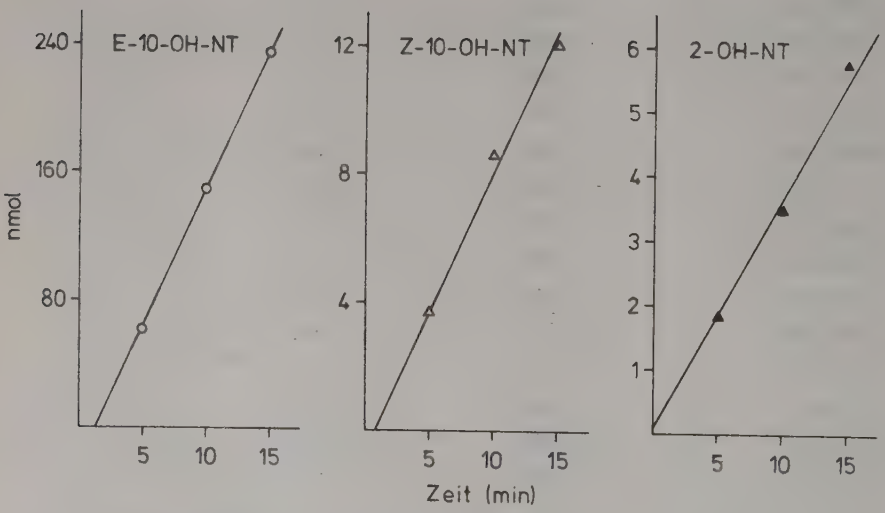


Abb. 7. Abhängigkeit der gebildeten Metaboliten von der Inkubationszeit (0,5 mM NT, 4 mg mikrosomales Protein/2 ml Inkubationsansatz)

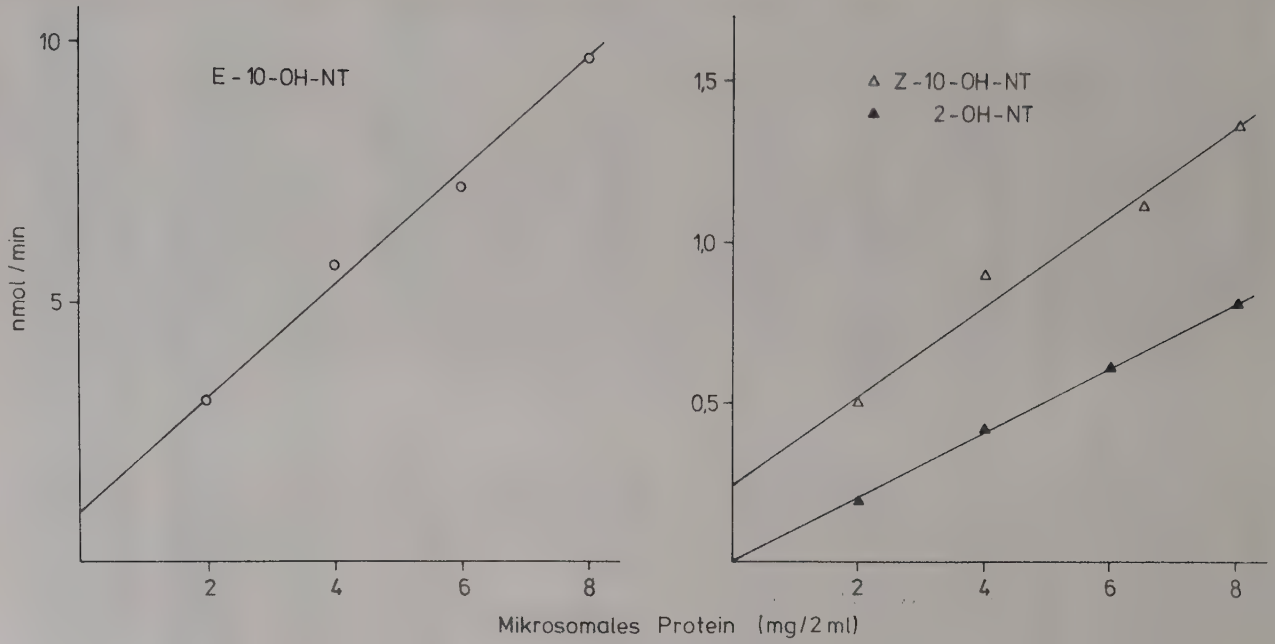


Abb. 6. Abhängigkeit der gebildeten Metabolitenmengen von der Menge an mikrosomalem Protein (0,5 mM NT, 4 mg mikrosomales Protein/2 ml Inkubationsansatz).

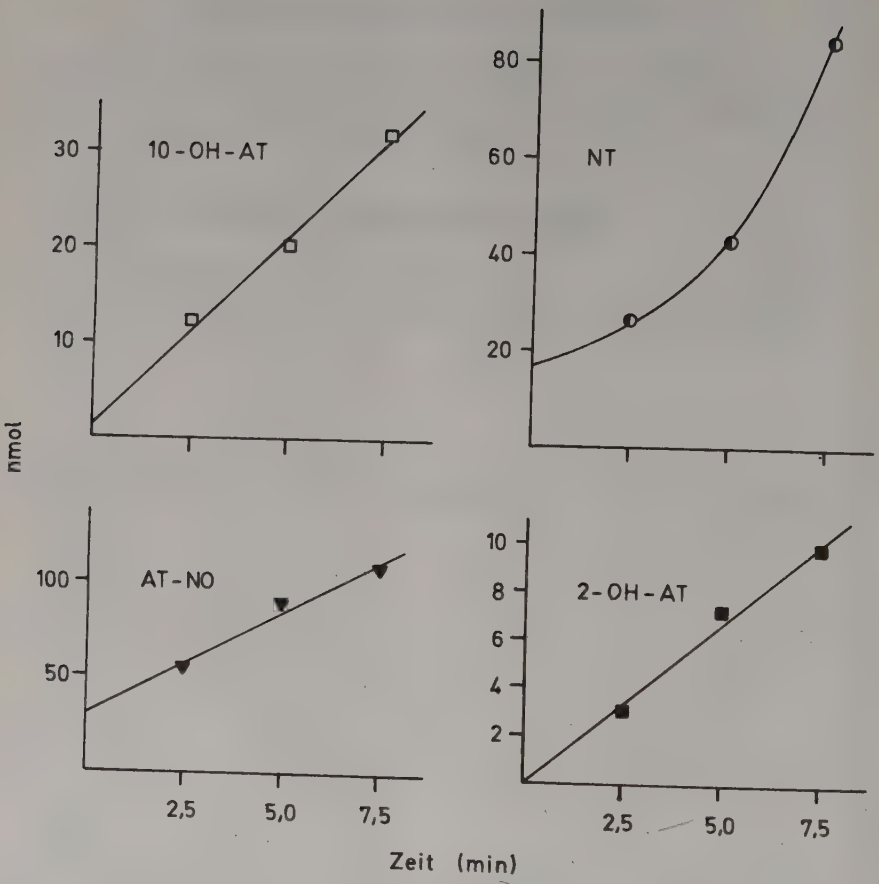


Abb. 8. Abhängigkeit der gebildeten Metaboliten von der Inkubationszeit (0,5 mM AT, 4 mg mikrosomales Protein/2 ml Inkubationsansatz)

3.1.3.3. ABHÄNGIGKEIT VON DER SUBSTRATKONZENTRATION

Variation der NT-Konzentration zwischen 0,05 und 0,5 mM führte mit Mikrosomen unvorbehandelter Ratten nicht zu einer deutlichen Veränderung der gebildeten Metabolitenmengen. Mit Mikrosomen PCN-vorbehandelter Ratten entstand bei einer Anfangskonzentration von 0,5 mM NT etwas weniger Z-10-OH-NT und 2-OH-NT als bei Verwendung niedrigerer Konzentrationen (Tab.5).

Tab. 5. Abhängigkeit der gebildeten Metabolitenmengen von der Substratkonzentration (10 mg mikrosomales Protein/5 ml, 3 min)

NT-Konzentration (mM)	Bildungsgeschwindigkeit (nmol·mg Protein^{-1}·min^{-1})					
	E-10-OH-NT		Z-10-OH-NT		2-OH-NT	
	Kontrolle	PCN	Kontrolle	PCN	Kontrolle	PCN
0,05	1,6	1,1	0,24	0,16	0,13	0,14
0,1	1,28	2,1	0,16	0,15	0,14	0,12
0,2	1,05	1,0	0,13	0,15	0,1	0,11
0,5	1,43	1,2	0,25	0,1	0,15	0,06
0,5[a]	1,7	1,55	0,3	0,26	0,11	0,14

[a] 4 mg mikrosomales Protein/2 ml, 10 min.

3.1.4. DIE WIRKUNG DER VORBEHANDLUNG DER RATTEN MIT PB, BF UND PCN

3.1.4.1. RELATIVES LEBERGEWICHT UND MIKROSOMALES PROTEIN

Bei den Kontrollratten betrug das relative Lebergewicht 3,1 %; die Ausbeute an mikrosomalem Protein lag bei 12,3 mg/g Leber.
Bei Vorbehandlung mit PB oder PCN stieg das relative Lebergewicht

deutlich an. Die Ausbeute an mikrosomalem Protein war bei PB-behandelten Ratten erhöht (Tab. 6).

Tab. 6. Einfluss der Vorbehandlung der Ratten auf relatives Lebergewicht und bei der Präparation erhaltene Menge an mikrosomalem Protein ($\bar{X} \pm S_x$, n = 4)

Vorbehandlung	relatives Lebergewicht (g/100 g KG)	mikrosomales Protein (mg/g Leber)
PB	3,6 ± 0,4*	21,2 ± 5,4*
H_2O	2,9 ± 0,5	11,9 ± 2,5
BF in Maisöl	3,2 ± 0,3	14,4 ± 2,4
Maisöl	3,1 ± 0,4	13,3 ± 1,5
PCN in Tween 80	4,2 ± 0,2*	11,3 ± 3,1
Tween 80	3,2 ± 0,3	11,7 ± 3,3

* $P < 0,05$ für den Unterschied zur jeweiligen Kontrollgruppe bei paarweisem Vergleich.

3.1.4.2. GEHALT AN DEN CYTOCHROMEN b_5 UND P-450

Im Gehalt an Cytochrom b_5 zeigte sich nach Behandlung mit BF und PB keine wesentliche Änderung gegenüber den Kontrollen. Nach PCN-Behandlung betrug die Zunahme 38 %. Das Cytochrom P-450 stieg nach PB- und PCN-Behandlung um 88 % bzw. 83 % (Tab. 7).

Tab. 7. Einfluss der Vorbehandlung der Ratten auf den Gehalt an den Cytochromen b_5 und P-450 ($\bar{X} \pm S_x$, n = 4)

Vorbehandlung	Cytochrom b_5 (nmol·mg mikrosomales Protein^{-1})	Cytochrom P-450 (nmol·mg mikrosomales Protein^{-1})
PB	1,06 ± 0,16	1,99 ± 0,33*
H_2O	0,92 ± 0,14	1,06 ± 0,10
BF in Maisöl	0,69 ± 0,15	1,35 ± 0,66
Maisöl	0,62 ± 0,10	1,17 ± 0,32
PCN in Tween 80	0,80 ± 0,20	1,87 ± 0,39*
Tween 80	0,58 ± 0,04	1,02 ± 0,10

* $P < 0,05$

3.1.4.3. DIE BILDUNG DER METABOLITEN

Es wurde gezeigt, daß bei der Inkubation mit Rattenlebermikrosomen neben der aliphatischen Hydroxylierung, Demethylierung und N-Oxidation auch eine aromatische Hydroxylierung von AT und NT vorkommt. Bei der NT-Inkubation wurden E-10-OH-NT, Z-10-OH-NT, 2-OH-NT, DNT und bei der AT-Inkubation 10-OH-AT, AT-NO, 2-OH-AT und NT bestimmt. Die in Mikrosomen der Kontrollratten gebildeten Mengen an Metaboliten wurden mit denen von PB-, BF- und PCN-behandelten Ratten verglichen (Tab. 8-10). Die meisten Metaboliten wurden in signifikant geringerer Menge gebildet, wenn die Ratten mit PB oder BF vorbehandelt waren. Ausnahmen davon waren die nach PB gesteigerte Geschwindigkeit der N-Demethylierung und 10-Hydroxylierung von AT. PCN-Behandlung führte zu keiner Veränderung abgesehen von verminderter AT-NO-Bildung.

Tab. 8. Die Metaboliten von AT und NT bei der Inkubation mit Mikrosomen von Kontroll- und PB-behandelten Ratten.

($\bar{X} \pm S_x$, n = 4)

Metaboliten	Kontrolle	PB
	(nmol·mg mikrosomales Protein^{-1}·min^{-1})	
NT-Inkubation:		
E-10-OH-NT	2,02 ± 0,52	1,24 ± 0,55*
Z-10-OH-NT	0,23 ± 0,05	0,15 ± 0,01*
2-OH-NT	0,11 ± 0,02	0,07 ± 0,01*
DNT	0,31 ± 0,04	0,20 ± 0,06*
AT-Inkubation:		
2-OH-AT	0,36 ± 0,04	0,19 ± 0,03*
AT-NO	4,50 ± 1,11	1,72 ± 0,16*
10-OH-AT	1,53 ± 0,07	1,94 ± 0,40*
NT	4,37 ± 0,35	5,51 ± 0,58*

* $P < 0,05$

Tab. 9. Die Metaboliten von AT und NT bei der Inkubation mit Mikrosomen von Kontroll- und BF-behandelten Ratten.

($\bar{X} \pm S_x$, n = 4)

Metaboliten	Kontrolle	BF
	(nmol·mg mikrosomales Protein^{-1}·min^{-1})	
NT-Inkubation:		
E-10-OH-NT	1,75 ± 0,26	0,92 ± 0,35*
Z-10-OH-NT	0,25 ± 0,02	0,19 ± 0,06
2-OH-NT	0,15 ± 0,03	0,09 ± 0,05*
AT-Inkubation:		
2-OH-AT	0,33 ± 0,07	0,21 ± 0,08*
AT-NO	3,67 ± 0,64	2,73 ± 0,03*
10-OH-AT	1,38 ± 0,15	1,06 ± 0,29*
NT	5,16 ± 1,12	2,95 ± 0,40*

* $P < 0,05$

Tab. 10. Die Metaboliten von AT und NT bei der Inkubation mit Mikrosomen von Kontroll- und PCN-behandelten Ratten.

($\bar{X} \pm S_x$, n = 4)

Metaboliten	Kontrolle	PCN
	(nmol·mg mikrosomales Protein^{-1}·min^{-1})	
NT-Inkubation:		
E-10-OH-NT	1,69 ± 0,37	1,50 ± 0,19
Z-10-OH-NT	0,25 ± 0,05	0,21 ± 0.02
2-OH-NT	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,02
DNT	0,55 ± 0,09	0,54 ± 0,05
AT-Inkubation:		
2-OH-AT	0,25 ± 0,10	0,20 ± 0,08
AT-NO	4,34 ± 0,73	2,27 ± 0,50*
10-OH-AT	1,62 ± 0,16	1,50 ± 0,35
NT	3,93 ± 0,39	4,78 ± 0,55

* $P < 0,05$

3.2. UNTERSUCHUNGEN IN VIVO MIT AMITRIPTYLIN

3.2.1. IDENTIFIZIERUNG DER METABOLITEN

3.2.1.1. FLIESSMITTEL UND R_F-WERTE

Die R_F-Werte von Metaboliten in verschiedenen Fliessmitteln sind in Tab. 11 aufgeführt. Die Metaboliten stimmten im R_F-Wert mit denen der Vergleichssubstanzen überein.

3.2.1.2. UV-SPEKTREN

Das Spektrum von jedem Metaboliten wurde in Säure und in Alkali gemessen. Die Absorptionspeaks der getrennten Metaboliten und entsprechenden Vergleichssubstanzen erwiesen sich als identisch (Tab. 11).

3.2.1.3. FARBREAKTIONEN AUF DEM CHROMATOGRAMM

Die Metaboliten färbten sich auf den DC-Folien mit Sprühreagentien genau so wie die Vergleichssubstanzen (Tab. 11).

3.2.1.4. CHEMISCHE REAKTION

Die bei Säurebehandlung von NT-DHD erhaltene Substanz wurde durch die UV-Spektren in Säure und in Alkali, R_F-Werte und Farbreaktionen als 2-OH-NT identifiziert (s. Tab. 11).

Tab. 11. Die UV-Peaks, R_F-Werte und Farbreaktionen von AT und seinen Metaboliten in den verwendeten Fließmitteln

Metaboliten	UV-Peaks in		R_F-Werte				Farbreaktionen	
	H_2SO_4	NaOH	A_1	A_2	B	D	$FeCl_3$/ H_2SO_4	Ninhydrin
AT	240	240		0,81	0,78		farblos	farblos
NT	240	240	0,87			0,47	"	viol.
2-OH-AT	250	270	0,73	0,33	0,73	0,77	gelb	farblos
10-OH-AT	240	240	0,89	0,62	0,71	0,75	grau-grün	"
AT-NO	240	240	0,17			0,53	blau	"
2,10-$(OH)_2$-AT	245	270	0,18			0,59	braun	"
10,11-$(OH)_2$-AT	240	240	0,64			0,48	rot*	"
AT-DHD	280	280	0,41		0,51	0,63	gelb-braun	blaß viol.
NT-DHD	280	280	0,17		0,14		"	"
2-OH-NT	250	270	0,53			0,5	gelb	viol.
E-10-OH-NT	240	240	0,56		0,25	0,27	grün	viol.
Z-10-OH-NT	240	240	0,63				"	"
2,10-$(OH)_2$-NT	240	270	0,11			0,21	braun	farblos
10,11-$(OH)_2$-NT	240	240	0,23			0,28	rot*	"
2-OH-10-Oxo-NT	235 330	235 380	0,47				braun	braun
10-OH-AT-NO	240	240	0,04			0,45	blau	farblos
2,10,11-$(OH)_3$-AT	-	270	0,06			0,5	grau	"
3,11-$(OH)_2$-AT	290	310	0,27				"	"
2-OH-10-Oxo-AT	235 330	235 380	0,62			0,68	braun	"
3-OH-10,11-Dehydro-AT	300	330	0,59			0,72	grau	"

* beim Erkalten Übergang in Gelb.

3.2.2. ENZYMATISCHE HYDROLYSE KONJUGIERTER METABOLITEN

Nach oraler Gabe von AT an Kaninchen ist die Konzentration der Metaboliten im Harn in den ersten 24 Stunden am höchsten. An diesen Harnportionen wurde das Analysenverfahren überprüft und dabei festgestellt, daß Inkubation mit 1 ml β-Glucuronidase/Arylsulfatase pro 100 ml Harn nicht zu voller Hydrolyse der konjugierten Metaboliten führt.
Bei Wiederholung der Hydrolyse und Extraktion ließen sich vor allem beträchtliche weitere Mengen an 10-OH-AT und E-10-OH-NT (125 % bzw. 36 % der anfangs isolierten Mengen) gewinnen (Tab. 13). Geringere Mengen wurden bei der zweiten Hydrolyse erhalten, wenn bei der ersten Hydrolyse das Harnvolumen und damit die Enzymmenge etwa doppelt so groß waren. Es wäre also ratsam, bei weiteren Versuchen von vornherein größere Mengen Enzym zu verwenden.
Wesentlich leichter als die aliphatischen wurden die aromatischen Hydroxylierungsprodukte freigesetzt. Von 2-OH-AT wurden nach erneuter Inkubation nur 2 % der anfangs isolierten Mengen gewonnen. Auffälligerweise lagen die Mengen an freigesetztem Z-10-OH-NT bei erneuter Hydrolyse auch nur bei 0 - 19 % derjenigen bei der ersten Hydrolyse.

3.2.3. NICHT-KONJUGIERTE UND KONJUGIERTE METABOLITEN

Der Hundeharn enthält vergleichbare Mengen der Metaboliten in nicht-konjugierter und konjugierter Form (Tab. 12), während beim Kaninchen die konjugierten Metaboliten überwiegen. Darum wurden im vorliegenden Experiment die nicht-konjugierten Metaboliten beim Kaninchen nicht gesondert extrahiert.

3.2.4. UNTERSUCHUNGEN BEIM HUND

3.2.4.1. METABOLITEN VON AT IM HARN

Die ungefähren Mengen der Metaboliten von AT im Hundeharn werden in Tab. 12 gezeigt. Mengenmäßig überwogen AT-DHD in freier sowie 10-OH-AT und E-10-OH-NT in konjugierter Form.

Tab. 12. Die Hauptmetaboliten von AT im Hundeharn.

Metaboliten	Zeit nach Gabe (h)	Menge (µmol)	(% der Dosis)
NT-DHD	0 - 36 frei	0,35	0,12
	0 - 36 konj.	0,29	0,10
AT-DHD	0 - 36 frei	9,42	3,27
	0 - 36 konj.	1,83	0,63
E-10-OH-NT	0 - 36 frei	0,45	0,15
	0 - 23 konj.	2,19	0,76
10-OH-AT	0 - 23 frei	0,37	0,13
	0 - 48 konj.	3,91	1,36
2-OH-NT	0 - 12 frei	0,12	0,04
	0 - 23 konj.	0,24	0,08
2-OH-AT	0 - 23 frei	0,31	0,11
	0 - 23 konj.	0,3	0,10
AT	0 - 12 frei	0,25	0,09
		Summe	6,94

Außer diesen Metaboliten wurden qualitativ andere Metaboliten, nämlich 10,11-$(OH)_2$-NT, 10,11-$(OH)_2$-AT, AT-NO, 10-OH-AT-NO und 2-OH-10-Oxo-AT, identifiziert.

3.2.5. UNTERSUCHUNGEN BEIM KANINCHEN

3.2.5.1. METABOLITEN VON AT IM HARN

Bei einem Mischrasse-Kaninchen erschien etwa die Hälfte der nach Hydrolyse extrahierbaren Metaboliten während der ersten 24 h im Harn. Dagegen schieden Neuseeländer-Kaninchen einen größeren Teil der Dosis im Harn aus und davon über 90 % am ersten Tag (Tab. 13).

Tab. 13. Zeitverlauf der Ausscheidung von AT-Metaboliten im Kaninchenharn.

Nr.	Rasse	Metaboliten im Harn (% der Dosis)		
		0 - 24 h	24 -48 h	48 - 72 h
1	Mischrasse	2,62[T]	2,08[T]	0,32[T]
2	Neuseeländer	9,13[TT]		0
3	"	9,25	0,48	0
4	"	8,31	0,24	0

[T] Werte bei einmaliger Inkubation mit ß-Glucuronidase/Arylsulfatase
[TT] 0 - 48 h.

Die in größter Menge gefundenen Metaboliten waren 10-OH-AT und 2-OH-AT, gefolgt von OH-OCH_3-AT, 3-OH-AT, E-10-OH-NT und 2,10-$(OH)_2$-AT (-NT). Als Beispiel werden in Tab. 14 die bei Kaninchen Nr. 3 erhaltenen Werte aufgeführt, zusammen mit den Ergebnissen bei Wiederholung der enzymatischen Hydrolyse (s. 3.2.2.).

Tab. 14. Metaboliten von AT aus Harn von einem Kaninchen

(0 - 24 h, 70 ml)

Metaboliten	Menge (/umol) Hydrolyse I	II	Summe I + II (% der Dosis)
2,10-$(OH)_2$-NT	0,41	0,32	0,43
AT-NO	0,18	-	0,11
10,11-$(OH)_2$-NT	0,09	-	0,05
2,10-$(OH)_2$-AT	1,15	-	0,67
10,11-$(OH)_2$-AT	0,13	-	0,08
3,11-$(OH)_2$-AT	0,68	0,20	0,51
3-OH-AT	1,38	0,36	1,01
2-OH-NT	0,56	-	0,33
E-10-OH-NT	1,09	0,39	0,86
Z-10-OH-NT	0,34	-	0,20
NT	0,29	-	0,17
2-OH-AT	2,64	0,06	1,56
OH-OCH_3-AT	1,22	0,4	0,94
10-OH-AT	1,79	2,24	2,33
		Summe	9,25

Außer diesen Metaboliten wurden 10-OH-AT-NO, 2,10,11-$(OH)_3$-AT und 3-OH-10,11-Dehydro-AT identifiziert.

3.2.5.2. METABOLITEN VON AT IM HARN NACH PB-BEHANDLUNG

Die Metabolitenmengen im Harn eines Kaninchens ohne und mit PB-Vorbehandlung wurden in Tab.15 verglichen. Die Ergebnisse beziehen sich nur auf die erste Hydrolyse.

Tab. 15. Metaboliten von AT aus Kaninchenharn ohne und mit PB-Behandlung (0 - 72 h)

Metaboliten	ohne Behandlung		PB-Behandlung	
	Menge		Menge	
	(µmol)	(% der Dosis)	(µmol)	(% der Dosis)
2-OH-AT	7,57	2,26	8,82	2,66
2-OH-NT	2,23	0,67	2,45	0,74
OH-OCH_3-AT	1,66	0,50	0,88	0,27
10-OH-AT	1,57	0,47	0,52	0,16
E-10-OH-NT	1,20	0,36	0,59	0,18
NT	1,15	0,34	0,35	0,11
2,10-$(OH)_2$-NT	0,68	0,20	0,46	0,14
2,10-$(OH)_2$-AT	0,17	0,05	0,21	0,06
10,11-$(OH)_2$-NT	0,05	0,01	0,06	0,02
10,11-$(OH)_2$-AT	0,57	0,17	0,67	0,20
	Summe	5,03	Summe	4,54

4. DISKUSSION

Obwohl AT und NT schon seit langem therapeutisch verwendet werden und intensive Untersuchungen über ihren Metabolismus vorliegen, konnten von anderen Autoren keine phenolischen Metaboliten identifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels verschiedener Methoden nachgewiesen, daß die Oxidation der aromatischen Ringe von AT und NT an den Stellen 2 und 3 tatsächlich zu der Bildung einer Reihe von phenolischen Metaboliten führt. Die wiederholte dünnschichtchromatographische Trennung erlaubt unter Benutzung verschiedener Fließmittelsysteme die Isolierung von Einzelkomponenten aus sehr komplexen Mischungen von Metaboliten im Harn. Ihre Identifizierung anhand von Vergleichssubstanzen gelang mit Hilfe der charakteristischen UV-Spektren in Säure und in Alkali, durch Vergleich der R_F-Werte und durch Farbreaktionen. So ließ sich zeigen, daß Phenole als Stoffwechselprodukte von AT außer bei Ratte und Mensch (Breyer-Pfaff et al., 1980) auch beim Hund und Kaninchen vorkommen, bei letzterem ist die aromatische Hydroxylierung einer der wichtigsten metabolischen Wege. Durch die vorliegenden Experimente wurde eine aromatische Hydroxylierung von AT und NT auch in vitro unter Verwendung von Rattenlebermikrosomen nachgewiesen.

Obgleich die aromatische Hydroxylierung somit bei mehreren Spezies beobachtet wird, existieren große qualitative und quantitative Unterschiede zwischen diesen. Im Harn AT-behandelter Patienten bildet 10-OH-NT in freier und konjugierter Form den Hauptmetaboliten (Biggs et al., 1979). In wesentlichen Mengen treten auch 10-OH-AT (Santagostino et al., 1974) und mehrfach aliphatisch hydroxylierte Produkte auf (Breyer-Pfaff, persönliche Mitteilung). Phenolische Metaboliten ließen sich dagegen nur in geringen Mengen nachweisen und nur mit einer OH-Gruppe in 2-Stellung (Breyer-Pfaff et al., 1980).

Beim Hund wurde nach AT-Gabe als Hauptmetabolit im Harn AT-DHD nachgewiesen, und zwar hauptsächlich in freier Form (Hucker et al., 1977). Es konnte hier gezeigt werden, daß neben AT-DHD, NT-DHD und aliphatisch hydroxylierten Metaboliten auch 2-OH-AT, 2-OH-NT und 2-OH-10-Oxo-AT in geringer Menge auftreten.

Beim Kaninchen war das Konjugat von 2-OH-AT neben dem von 10-OH-AT Hauptbestandteil der hydrolysierbaren Metaboliten im Harn. Daneben wurden nach enzymatischer Dekonjugation beträchtliche Mengen an 3-OH-AT und mehrfach hydroxylierten Produkten gewonnen: 2,10-$(OH)_2$-AT und -NT, 3,11-$(OH)_2$-AT und OH-OCH_3-AT.

Es stellt sich die Frage, warum der Angriff am aromatischen System beim Hund zur Ausscheidung von Dihydrodiolen, beim Kaninchen von Phenolen führt. Die Dihydrodiole könnten eine Zwischenstufe bei der Bildung von Phenolen darstellen. Tatsächlich ließ sich zeigen, daß aus NT-DHD bei Säurebehandlung 2-OH-NT entsteht. Diese Reaktion könnte auch bei der Aufarbeitung des Harns ablaufen, etwa während der Inkubation mit Glucuronidase/Arylsulfatase. Weiter besteht die Möglichkeit, daß das intermediär gebildete Epoxid beim Kaninchen in anderer Weise weiter umgesetzt wird als beim Hund. Das Auftreten von 3-OH-AT und 2-OH-3-OCH_3-AT (oder 3-OH-2-OCH_3-AT) deutet darauf, daß vielleicht beim Kaninchen (und bei der Ratte) ein 2,3-Epoxid gebildet wird, das sich zu 2-OH-AT und 3-OH-AT isomerisiert oder über eine Dihydrodiol- und Catechol-Stufe zur Hydroxy-methoxy-Verbindung umgesetzt wird. Beim Hund muß das 1,2-Epoxid Zwischenstufe der Dihydrodiol-Bildung sein. Die bevorzugte Umsetzung durch Epoxid-hydrolase steht damit in Einklang, daß dieses Enzym in Lebermikrosomen von Hunden eine höhere Aktivität besaß als in denen von Ratten (Golan et al., 1980). Allerdings besitzt das Kaninchen ebenfalls eine sehr aktive mikrosomale Epoxid-hydrolase (Walker et al., 1978). Schließlich ist noch zu erwägen, daß beim Kaninchen die Einführung von OH-Gruppen in den aromatischen Ring direkt erfolgt ohne Durchlaufen einer Epoxid-Zwischenstufe.

Nach PB-Vorbehandlung zeigten die Metabolitenmengen im Kaninchenharn eine Tendenz zum Anstieg der 2-Hydroxylierung und zur Verminderung der 10-Hydroxylierung an. Es ist möglich, daß an den Reaktionen verschiedene Formen von Cytochrom P-450 beteiligt sind, deren Verhältnis durch PB verändert wird.

Die quantitativen Angaben über die Metabolitenmengen im Kaninchen-

harn sind nicht als ganz sicher zu bewerten , weil sich erst im Laufe der Untersuchungen herausstellte, daß die anfangs eingesetzte Enzymmenge nicht ausreichte, um bei hoher Metabolitenkonzentration die Konjugate vollständig zu spalten. Weitere Inkubationen führten vor allem zur Freisetzung von 10-hydroxylierten Metaboliten, während die Phenolkonjugate offenbar leichter hydrolysierbar sind. In zukünftigen Untersuchungen sollte von vornherein mit einer größeren Enzymmenge gearbeitet werden.

Die Summe der analysierten Metaboliten betrug höchstens ca. 10 % der Dosis. Der Rest kann in den Faeces ausgeschieden worden sein, oder es kann sich um nicht-hydrolysierbare wasserlösliche Metaboliten im Harn gehandelt haben. Ein geringer Teil dürfte auch bei der Aufarbeitung verloren gegangen sein.

Es war von großem Interesse, auch in vitro die aromatische Hydroxylierung nachzuweisen. Dies gelang für AT und NT unter Verwendung von Rattenlebermikrosomen. Es wurden zwei Reaktionen, nämlich die Umsetzung von AT zu 2-OH-AT und die von NT zu 2-OH-NT, quantitativ verfolgt und mit den aliphatischen Hydroxylierungen verglichen.
Das Verhältnis von 2-OH-NT zu E-10-OH-NT betrug etwa 1 : 12-14, das Verhältnis von 2-OH-AT zu 10-OH-AT etwa 1 : 4,5. Nach PB-Behandlung lagen die Verhältnisse bei 1 : 18 bzw. 1 : 14 und nach BF-Behandlung 1 : 10,7 bzw. 1 : 4,7. Bei der PCN-Behandlung änderte sich das Verhältnis nicht; es betrug bei der NT-Serie 1 : 16-17 und bei der AT-Serie 1 : 7,5. Das Verhältnis in der AT-Serie nach PB-Behandlung verschob sich, weil einerseits die 10-OH-AT-Bildung etwas zunahm und andererseits die 2-OH-AT Bildung signifikant abnahm; in der NT-Serie verschob sich das Verhältnis nicht viel, weil die Bildung von beiden Metaboliten signifikant abnahm. Die Tatsache, daß nach PB-Behandlung die 10-OH-AT-Bildung zunahm und gleichzeitig die 2-OH-AT-Bildung abnahm, bestärkt die Vermutung, daß die beiden Reaktionen durch verschiedene Formen von Cytochrom P-450 katalysiert werden. Es fällt aber auf, daß das Verhältnis von 2- und 10-Hydroxylierung sich nach PB-Behandlung bei der Ratte in vitro in umgekehrter Richtung verändert wie beim Kaninchen in vivo.
Die Verhältnisse der Metaboliten in der Rattengalle waren anders als

in vitro : 2-OH-NT zu E-10-OH-NT etwa 1 : 6,5 nach NT-Gabe, 2-OH-AT zu 10-OH-AT 1 : 1,4 nach AT-Gabe (Breyer-Pfaff, persönliche Mitteilung). Eine deutliche Diskrepanz fand sich auch für das Verhältnis von 2-OH-NT zu Z-10-OH-NT, das in vivo 1 : 0,22, in vitro jedoch 1 : 2 betrug. Daraus ergibt sich, daß die 2-Hydroxylierung von NT und AT in vitro relativ verlangsamt stattfindet.

Nach Vorbehandlung mit PB, BF und PCN sollte man eine beschleunigte Metabolisierung als Folge eines Induktionseffektes erwarten. In den jetzigen Experimenten ließ sich tatsächlich ein Induktionseffekt nachweisen. Nach PB-Behandlung waren die mikrosomalen Proteine, bezogen auf ein Gramm Feuchtgewicht Leber, fast verdoppelt. Der Gehalt an Cytochrom P-450 und das relative Lebergewicht stiegen bei PB- und PCN-Behandlung ebenfalls an.
Von Bahr (1972) und Buening & Franklin (1974) untersuchten den Einfluß einer PB-Vorbehandlung auf die Bildung von 10-OH-NT in Lebermikrosomen von Ratten und stellten fest, daß die Reaktion verlangsamt wurde. Dieser Befund stimmt mit dem hier erhobenen überein. Zusätzlich war auch die Bildung von 2-OH-NT signifikant erniedrigt. Im Falle der Inkubation von AT mit Mikrosomen PB-vorbehandelter Ratten waren einige Metaboliten signifikant erniedrigt, nämlich 2-OH-AT und AT-NO, aber die Menge an NT und 10-OH-AT hatte zugenommen. Remmer et al. (1979) nannten die Metabolisierungshemmung nach PB-Behandlung einen paradoxen Induktionseffekt. Man nimmt an, daß eine der P-450-Formen durch Bildung eines sogenannten metabolischen Intermediärkomplexes (MI-Komplex) mit Aminen gehemmt werden kann (Buening & Franklin, 1974). Die MI-Komplexe werden auch mit Verbindungen gebildet, die für die eine oder die andere Form des Cytochrom P-450 Substrat sein können. Nach der Oxidation lagern sie sich als sechster Ligand an die reduzierte Form von Cytochrom P-450 an und können dadurch die Bindung und Aktivierung des Sauerstoffes für die Monooxygenase-Reaktion verhindern. Nach den Ausführungen von Franklin (1977) sind primäre, sekundäre und tertiäre Amine die wichtigsten Kandidaten für den MI-Komplex, weil sie ein freies Elektron zur Verfügung haben, aber es scheint, daß tertiäre Amine erst einmal dealkyliert werden müssen, bevor sie so reagieren können. NT gehört zu den sekundären Aminen, die MI-Komplex bil-

den und damit einen beträchtlichen Anteil des Cytochrom P-450 in seiner Aktion hemmen können. Man kann annehmen, daß AT, ein tertiäres Amin, erst zu NT dealkyliert werden muß und dann einen MI-Komplex bildet und die Aktivität des Cytochrom P-450 herabsetzt. Dies könnte ein Grund dafür sein, daß der Metabolismus von AT zu NT und zu 10-OH-AT nicht gehemmt, sondern beschleunigt ist.
Die vorliegenden Experimente unterstützen das Konzept, daß unter bestimmten Bedingungen eine paradoxe Wirkung durch Induktionsmittel hervorgerufen werden kann und sprechen für die Theorie von Franklin. Man weiß, daß neben den gut bekannten Cytochrom-Formen P-450 und P-448 noch weitere Formen des P-450 bestehen, und damit kann das genannte Phänomen erklärt werden. Einige Formen können vermehrt werden, aber die Hauptform, die für den Metabolismus von NT zuständig ist, wird über einen MI-Komplex gehemmt.
Es wurden noch zwei weitere Induktionsmittel, BF und PCN, verwendet. Nach BF-Behandlung war die Menge an den Cytochromen b_5 und P-450 nicht vergrößert. BF induziert das Cytochrom P-448, welches weder NT noch AT metabolisiert. Im Gegenteil, wenn Cytochrom P-448 vermehrt wird und dabei die Gesamtmenge an mikrosomalen Cytochromen unverändert bleibt, sollte man annehmen, daß die Menge an Cytochrom P-450 abnehmen muß. Dies könnte erklären, warum nach BF-Vorbehandlung der Tiere der AT-und NT-Metabolismus in vitro vermindert ist. PCN-Vorbehandlung führte zu keiner Veränderung abgesehen von verminderter AT-NO-Bildung. Die Bildung von N-Oxiden aus tertiären Aminen wird nicht von Cytochrom P-450 vermittelt, sondern von einem Flavoprotein, einer Amin-oxidase, die auch im Lebermikrosomen lokalisiert ist (Ziegler et al., 1969; Bickel,1971,1972). Es ist möglich, daß das Verhältnis dieses Enzyms zu anderen mikrosomalen Enzymen sich nach PB- und PCN-Vorbehandlung erniedrigt.

Die aromatische Hydroxylierung spielt bei einigen Spezies quantitativ eine wichtige Rolle im Metabolismus von AT und NT, und sie führt zu einer Vielzahl von Metaboliten. Es erscheint interessant, diese auf ihre pharmakologische Wirksamkeit und ihre Toxizität im Vergleich zu den Ausgangssubstanzen und den alkoholischen Metaboliten zu untersuchen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Arbeit war es festzustellen, ob eine Bildung phenolischer Metaboliten von Amitriptylin (AT) außer bei Ratte und Mensch auch bei weiteren Spezies, nämlich bei Kaninchen und Hund, abläuft. Parallel dazu wurde der Stoffwechsel von AT und Nortriptylin (NT) bei Ratten in vitro untersucht.

Der Hund und die Kaninchen bekamen 5 bzw. 20 mg/kg von AT per os, und es wurde Harn gesammelt. Die Metaboliten wurden daraus nach enzymatischer Hydrolyse durch Extraktion mit Chloroform und wiederholte Dünnschichtchromatographie isoliert und gereinigt. Ihre Charakterisierung erfolgte durch UV-Spektrometrie in Säure und in Alkali, durch chromatographischen Vergleich mit Metaboliten von Mensch und Ratte und durch Farbreaktionen auf dem Chromatogramm.

Beim Kaninchen findet eine Hydroxylierung der aromatischen Ringe von AT an den Stellen 2 und 3 statt. Die folgenden Metaboliten wurden in der größten Menge gefunden: 10-Hydroxy-AT und 2-Hydroxy-AT, gefolgt von 2-Hydroxy-3-methoxy-AT(oder 3-Hydroxy-2-methoxy-AT), 3-Hydroxy-AT, E-10-Hydroxy-NT, 2,10-Dihydroxy-AT und -NT, 3,11(oder 10)-Dihydroxy-AT, NT, AT-N-Oxid und 10,11-Dihydroxy-AT und -NT; in kleiner Menge nachweisbar waren: 10-Hydroxy-AT-N-oxid, 2,10,11-Trihydroxy-AT und 3-Hydroxy-10,11-dehydro-AT.

Bei einem Kaninchen führte Vorbehandlung mit 0,1 % Phenobarbital (PB) im Trinkwasser über 7 Tage zu einer Vermehrung von 2-Hydroxy-AT und -NT und einer Verminderung von 10-Hydroxy-AT und -NT im Harn.

Beim Hund traten im Harn außer den von früheren Autoren beschriebenen 1,2-Dihydrodiolen sowie den 10-hydroxylierten Metaboliten auch 2-Hydroxy-AT und -NT, 10,11-Dihydroxy-AT und 2-Hydroxy-10(oder 11)-oxo-AT auf.

Demnach findet bei beiden Spezies in erheblichen Ausmaß ein oxidativer Angriff am aromatischen System von AT statt, aber die Harnmetaboliten unterscheiden sich quantitativ und zum Teil auch qualitativ. Dies könnte mit der intermediären Bildung verschiedener Epoxide zu

erklären sein, nämlich in 1,2-Stellung beim Hund und in 2,3-Stellung beim Kaninchen.

Bei Inkubation von AT und NT mit Lebermikrosomen von unbehandelten männlichen Wistar-Ratten fand neben aliphatischer Hydroxylierung, N-Demethylierung und N-Oxidation in geringem Ausmaß aromatische Hydroxylierung, nämlich zu 2-Hydroxy-AT und 2-Hydroxy-NT, statt. Dies ließ sich nachweisen durch Extraktion der Inkubate, Dünnschichtchromatographie und direkte Photometrie auf der Platte. Die Identität der Metaboliten wurde gesichert durch zweidimensionale Chromatographie, Farbreaktionen und Messung des Spektrums auf der Platte.

Je 4 Ratten wurden mit PB (50 mg/kg per os, 9mal mit 12 h Intervall), ß-Naphthoflavon (BF, 80 mg/kg i.p.) und Pregnenolon-16α-carbonitril (PCN, 30 mg/kg per os, 5mal mit 12 h Intervall) behandelt. Das relative Lebergewicht und die Menge von Cytochrom P-450 waren signifikant erhöht bei PB- und PCN-behandelten Ratten, auch das mikrosomale Protein bei PB-behandelten. Die meisten Metaboliten wurden bei Inkubation mit Lebermikrosomen von PB-behandelten Ratten in signifikant geringerer Menge gebildet, nämlich E-10-Hydroxy-NT, Z-10-Hydroxy-NT, 2-Hydroxy-NT und Desmethyl-NT aus NT und 2-Hydroxy-AT und AT-N-Oxid aus AT. Die Metabolisierung von AT zu 10-Hydroxy-AT und NT war dagegen beschleunigt. Nach BF-Behandlung wurden alle Metaboliten signifikant langsamer gebildet abgesehen von Z-10-Hydroxy-NT. PCN-Behandlung veränderte nicht die Bildungsgeschwindigkeit der Metaboliten abgesehen von AT-N-Oxid.

Bei der Inkubation mit Mikrosomen unvorbehandelter Ratten betrug das Verhältnis von 2-Hydroxy-NT zu E-10-Hydroxy-NT etwa 1 : 12-14, von 2-Hydroxy-AT zu 10-Hydroxy-AT etwa 1 : 4,5. Dies bedeutet eine relativ viel langsamere 2-Hydroxylierung, als sie bei in-vivo-Versuchen aus der Zusammensetzung der Metaboliten in der Rattengalle hervorgeht. Nach PB-Behandlung lagen die Verhältnisse bei 1 : 18 bzw. 1 : 14, während sie nach BF- oder PCN-Behandlung kaum verändert waren.

Das Verhältnis zwischen aliphatischer und aromatischer Hydroxylierung von AT und NT ist demnach in vitro anders als in vivo und verändert

sich bei PB-Vorbehandlung. Diese Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die beiden Reaktionen von verschiedenen Subspezies des Cytochrom P-450 katalysiert werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Anderson,B.N., Herrikson,I.R.: Jaundice and eosinophilia associated with amitriptyline. J. clin. Psychiatry 39, 730-731 (1978)

Bertilsson,L., Alexanderson,B.: Stereospecific hydroxylation of nortriptyline in man in relation to interindividual differences in its steady-state plasma level. Eur. J. Clin. Pharmacol. 4, 201-205 (1972)

Bickel,M.H.: N-oxide formation and related reactions in drug metabolism. Xenobiotica 1, 313.319 (1971)

Bickel,M.H.: Liver metabolic reactions: Tertiary amine N-dealkylation, tertiary amine N-oxidation, N-oxide reduction, and N-oxide N-dealkylation. I. Tricyclic tertiary amine drugs. Arch. Biochem. Biophys. 148, 54-62 (1972)

Biggs,S.R., Chasseaud,L.F., Hawkins,D.R., Midgley,I.: Determination of amitriptyline and its major basic metabolites in human urine by HPLC. Drug Metab. Dispos. 7, 233-236 (1979)

Boobis,A.R., Nebert,D.W., Felton,J.S.: Comparison of ß-naphthoflavone and 3-methylcholanthrene as inducers of hepatic cytochrome(s) P-448 and aryl hydrocarbon (benzo(a)pyrene) hydroxylase activity. Mol. Pharmacol. 13, 259-268 (1977)

Breyer,U., Villumsen,K.: Measurement of plasma levels of tricyclic psychactive drugs and their metabolites by UV reflectance photometry of thin layer chromatigrams. Eur. J. Clin. Pharmacol. 9, 457-465 (1976)

Breyer-Pfaff,U., Ewert,M., Wiatr,R.: Comparative single-dose kinetics of amitriptyline and its N-oxide in a volunteer. Arzneim. -Forsch./Drug Res. 28(II), 10b, 1916-1920 (1978)

Breyer-Pfaff,U., Prox,A., Reuter,A., Yao,P.P.: Formation of phenolic metabolites from amitriptyline and nortriptyline in man and rat. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 311, Suppl. R 17 (1980)

Brinkschulte,M., Breyer-Pfaff,U.: Binding of tricyclic antidepressants and perazine to human plasma. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 308, 1-7 (1979)

Buening,M.K., Franklin,M.R.: The formation of complexes absorbing at 455 nm from cytochrome P-450 and metabolites of compounds related to SKF 525-A. Drug Metab. Dispos. 2, 386-390 (1974)

Corona,G.L., Facino,R.M.: Identification and evaluation of amitriptyline and its basic metabolites in rabbits urine. Biochem. Pharmacol. 17, 2045-2050 (1968)

De Leenheer,A., Heyndrickx,A.: Identification of a major metabolite of nortriptyline in human urine. J. Pharm. Sci. 60, 1403-1405 (1971)

Eschenhof,E., Rieder,J.: Untersuchungen über das Schicksal des Antidepressivums Amitriptylin im Organismus der Ratte und des Menschen. Arzneim.-Forsch./Drug Res. 19, 957-966 (1969)

Facino,R.M., Santagostino,G., Corona,G.L.: Presence of an acid metabolite of amitriptyline in rabbit urine. Biochem. Pharmacol. 19, 1503-1505 (1970)

Franklin,M.R.: Inhibition of mixed-function oxidations by substrates forming reduced cytochrome P-450 metabolic-intermediate complexes. Pharmac. Ther. A. 2, 227 (1977)

Golan,M.D., Bücker,M. et al.: Characterization of dog hepatic drug-metabolizing enzymes and resultant effects on benzo(a)pyrene metabolite pattern and mutagenicity. Drug Metab Dispos. 8,121-126 (1980)

Hammar,C.G., Alexanderson,B., Holmstedt,B., Sjöqvist,E.: Gas chromatography-mass spectrometry of nortriptyline in body fluids of man. Clin. Pharmacol. Ther. 12, 496-505 (1971)

Hucker,H.B., Balletto,A.J., Demetriades,J., Arison,B.H., Zacchei,A.G.: Urinary metabolites of amitriptyline in the dog. Drug Metab. Dispos. 5, 132-142 (1977)

Knapp,D.R., Gaffney,T.E., Mc Mahon,R.E., Kiplinger,G.: Studies of human urinary and biliary metabolites of nortriptyline with stable isotope labeling. J. Pharmacol. Exp. Ther. 180, 784-790 (1972)

Lowry,O.H., Resebrough,N.J., Farr,A.L., Randall,R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem. 193, 265-275 (1951)

Lu,A.Y.H., Somogyi,A., West,S., Kuntzman,R., Conney,A.H.: Pregnenolone-16 -carbonitrile: A new type of inducer of drug-metabolizing enzymes. Arch. Biochem. Biophys. 152, 457-462 (1972)

Mc Mahon,R.E., Marshall,F.J., Culp,H.W., Miller,W.H.: The metabolism of nortriptyline-N-Methyl-14C in rats. Biochem.Pharmacol. 12, 1207-1217 (1963)

Midgley,I., Hawkins,D.R., Chasseaud,L.F.: The metabolic fate of the antidepressive agent amitriptylinoxide in man. Arzneim.-Forsch./ Drug Res. 28(II), 10b, 1911-1916 (1978)

Morgan,D.H.: Jaundice associated with amitriptyline. Brit. J. Psychiat. 115, 105-106 (1969)

Netter,K.J.: Eine Methode zur direkten Messung der O-Demethylierung in Lebermikrosomen und ihre Anwendung auf die Mikrosomenhemmwirkung von SKF 525-A. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. exp. Path. Pharmak. 238, 292-300 (1960)

Omura,T., Sato,R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. J. biol. Chem. 239, 2370-2378 (1964)

Remmer,H., Fleischmann,R., Kunz, W.: Pharmacological consequences of induction of drug metabolizing enzymes. In ' The Induction of Drug Metabolism ' (R.W.Estabrook, E.Lindenlaub, eds.) 555-581 (1979)

Santagostino,G., Facino,R.M., Pirillo,D.: Urinary excretion of amitriptyline N-oxide in humans. J. Pharm. Sci. 63, 1690-1692 (1974)

Von Bahr,C., Schenkman,J.B., Orrenius,S.: Effect of phenobarbital and 3,4-benzypyrene treatment of rats on the microsomal binding and hydroxylation of nortriptyline and desmethylimipramine: Evidence for qualitative changes in cytochrome P-450-ligand interaction following phenobarbital treatment. Xenobiotica 2, 89-99 (1972)

Walker,C.H., Bentley,P., Oesch,F.: Phylogenetic distribution of epoxide hydratase in different vertebrate species, strains and tissues measured using three substrates. Biochem. Biophys. Acta 539, 427-434 (1978)

Whitnack,E., Knapp,D.R., Holmes,J.C., Fowler,N.O., Gaffney,T.E.: Demethylation of nortriptyline by the dog lung. J. Pharmacol. Exp. Ther. 181, 288-291 (1972)

Yon,J., Anuras,S.: Hepatitis caused by amitriptyline Therapy. JAMA, 232, 833-834 (1975)

Ziegler,D.M., Mitchell,C.H., Jollow,D.: The properties of purified hepatic microsomal mixed function amine oxidase. In: ' Microsomes and Drug Oxidations ' (Gillette,J.R., Conney,A.H. et al., eds.), 173-188 (1969)

Lebenslauf

Am 28. März 1936 wurde ich, Peipei YAO als Tochter des Yao Redin und seiner Ehefrau Mezin, in Shanghai (China) geboren. Von 1941 bis 1947 besuchte ich die Elementarschule in Shanghai, von 1947 bis 1953 absolvierte ich dort die Oberschule.

Das Studium der Medizin begann ich 1953/54 am I. Medizinischen Institut in Shanghai. Nach einem Sprachkurs 1954/55 am Peking-Institut für Fremdsprachen setzte ich es ab 1955 in Moskau am I. Medizinischen Institut fort und schloß es dort am 21. Juni 1961 in der Fachrichtung Medizin und Hygiene ab.

Ab Oktober 1961 arbeitete ich als Assistentin und von 1978 als Lecturer am Institut für Hygiene der Chinesischen Medizinischen Akademie.

Seit Oktober 1979 bin ich als Gast am Institut für Toxikologie der Universität Tübingen tätig.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. rer. nat. Dr. med. U. Breyer-Pfaff für die Anregung und Leitung der Arbeit sowie für ihre großzügige Unterstützung und die wertvollen Ratschläge.

Herrn Professor Dr. med. H. Remmer danke ich für den mir zur Verfügung gestellten Arbeitsplatz.

Herrn R. Wiatr, Herrn G. Joachim und Herrn W. Schneck habe ich für die technische Hilfe zu danken.

ifo druck
laubanger 15
8600 bamberg
tel.: 0951/6 43 21